

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude subcellulaire de fibroblastes embryonnaires murins déficients en hyaluronidase

Ingels, Aude

Award date:
2007

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Contribution à l'étude subcellulaire de fibroblastes embryonnaires murins déficients en
hyaluronidase**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Aude INGELS

Juin 2007

**Contribution à l'étude subcellulaire de fibroblastes embryonnaires murins déficients en
hyaluronidase**

INGELS Aude

Résumé

Ce mémoire a pour but d'explorer l'influence d'une absence du gène HYAL 1 dans des cellules embryonnaires fibroblastiques de souris (MEFs -/-). L'analyse de leur phénotype révèle l'apparition de vésicules denses aux électrons remplissant le cytoplasme. Comme l'enzyme Hyal 1 semble impliquée dans la dégradation de l'acide hyaluronique et être localisée en partie dans les lysosomes, une recherche précisant la nature des vésicules denses aux électrons a été réalisée en se focalisant sur les lysosomes. Comme la microscopie électronique suggérait également une morphologie atypique des mitochondries, l'impact de la déficience en HYAL 1 sur ces organites a aussi été exploré.

Les résultats montrent que la suppression du gène HYAL 1 n'a pas d'impact significatif sur l'activité des mitochondries ni sur la biogenèse enzymatique. Néanmoins, l'analyse des lysosomes montre une augmentation de leur masse au sein de la cellule ainsi que de leur taille, malgré une absence de différence notable en fractionnement complet par centrifugations différentielles. La coloration de Gomori a permis de préciser la similarité entre les vésicules caractérisant le phénotype des MEFs -/- et les lysosomes. L'étude de l'activité spécifique des enzymes lysosomales dans des homogénats cellulaires a révélé un déficit hautement significatif en β -galactosidase et presque significatif en β -glucuronidase. Le dosage d'autres enzymes lysosomales, en revanche, ne montre pas de différence significative par rapport aux MEFs contrôles. Une analyse de la densité d'équilibration de ces organites sur gradients de saccharose, Nycodenz ou Percoll ne révèle pas de divergence. L'hypothèse est donc posée que la déficience en HYAL 1 altère, directement ou indirectement, certaines fonctions lysosomales, ce qui conduit à un dysfonctionnement relatif de ces organites. L'ensemble des conséquences fonctionnelles de la déficience en HYAL 1 reste à définir.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2007

Promoteur: B. Flamion

Co-Promoteur : M. Jadot

Tables des abréviations

°C	Degré Celcius
A	Ampère
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
β-gal ou beta-gal	Bêta-galactosidase
bp	Paires de bases
BSA	Bovine serum albumine
Ca	Calcium
C	Carbone
CD44	Clusters of differentiation 44
CS	Chondroïtine sulfate
CTL	Contrôle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulphoxide
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	Foetal Bovine Serum
GAG	Glycoaminoglycan
GAL	Galactose
GalNac	Acide N-acétyl-galactosamine
GAPDH	Glyceraldehyde 3 Phosphate déshydrogénase
GlcNac	N-acétyl-glucosamine
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Acide Hyaluronique
HAS	Hyaluronane synthase
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horse-radish peroxydase
HYAL 1, 2, ...	Hyaluronidase 1, 2, ...
kDa	Kilo Dalton
LAMP	Lysosome-associated membrane protein
LBPA	Acide lysobisphosphatique
LDH	Lactate déshydrogénase
LIMP	lysosomal integral membrane protein
LUCA-1	Lung Cancer-1
LYVE-1	Lymphatic-vessel endothelial hyaluronan
M	Molaire
M6P	Mannose-6-Phosphate
M6PR	Récepteur de Mannose-6-Phosphate
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MET	Microscope Electronique à transmission
MPS	Mucopolysaccharide

MLS	Maladie de Surcharge Lysosomale
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide, oxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, réduit
nm	Nanomètre
PFA	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PM	Poids Moléculaire
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RE	Réticulum Endoplasmique
RF	Rnase Free
RHAMM	Receptor for hyaluronic-acid mediated motility
Rpm	Rotation par minute
RT-PCR	Reverse Transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium DodécylSulfate
SPAM-1	Sperm Adhesion Molecul-1
TAE	Tris-acétate EDTA
TEMED	N, N, N', N'tetramethylethylenediamine
U	Unité
UV	Rayon ultraviolet

Table des matières

1. Introduction.....	8
1.1. L'acide hyaluronique (HA) ou hyaluronan	8
1.1.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques	8
1.1.2. Localisations et rôles de l'acide hyaluronique	8
1.1.3. Synthèse de l'acide hyaluronique	9
1.1.4. Catabolisme de l'acide hyaluronique.....	9
1.1.5. Récepteurs de l'acide hyaluronique.....	9
1.2. Les hyaluronidases.....	10
1.2.1. Classifications des hyaluronidases	10
1.2.2. Les hyaluronidases de certains tissus et organes	11
1.2.3. Les hyaluronidases humaines	11
1.2.3.1. <i>Hyal 1</i>	11
1.2.3.2. <i>Hyal 2</i>	12
1.2.3.3. <i>Hyal 3</i>	12
1.2.3.4. <i>L'hyaluronidase testiculaire, PH-20/SPAM</i>	13
1.2.3.5. <i>Hyal 4</i>	13
1.2.3.6. <i>HyalPI</i>	13
1.2.4. Les hyaluronidases de la souris	13
1.3. Les lysosomes	13
1.3.1. Définition.....	13
1.3.2. Composition de la membrane des lysosomes	14
1.3.3. Les voies de transport des matériaux à digérer.....	14
1.3.3.1. <i>L'endocytose</i>	14
1.3.3.2. <i>La phagocytose</i>	14
1.3.3.3. <i>L'autophagie</i>	15
1.3.4. La biogenèse des enzymes lysosomales	15
1.3.4.1. <i>Introduction</i>	15
1.3.4.2. <i>Le trafic intracellulaire</i>	15
1.3.4.2.3. <i>Transport indépendant du mannose-6-phosphate</i>	16
1.3.4.2.4. <i>La route de l'endosome au lysosome</i>	17
1.3.5. Caractéristiques de certaines enzymes lysosomales	17
1.3.5.1. <i>La β-galactosidase</i>	17
1.3.5.2. <i>La β-glucosidase</i>	17
1.3.5.3. <i>La β-hexosaminidase</i>	17
1.3.5.4. <i>La β-glucuronidase</i>	18
1.4. Les maladies de surcharge lysosomale.....	18
1.4.1. Les déficits du transport	18
1.4.2. Les déficits enzymatiques.....	18
1.4.3. La mucopolysaccharidose du type IX.....	18
1.5. Les mitochondries	20
1.5.1. Définition.....	20
1.5.2. Composition	20
1.5.2.1. <i>La structure mitochondriale</i>	20
1.5.3. La respiration mitochondriale.....	21
1.5.4. Caractéristiques des enzymes mitochondriales étudiées dans le cadre du mémoire	22
1.5.4.1. <i>La cytochrome oxydase</i>	22
2. Buts et démarche du mémoire	23

3. Matériel et méthodes	25
3.1. Les MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts).....	25
3.1.1. Cultures cellulaires des MEFs	25
3.1.1.1. Description de la souris KO en HYAL1	25
3.1.1.2. Construction de l'altération génétique des KO	25
3.1.1.3. Méthode de culture des MEFs	25
3.2. Homogénats de MEFs.....	26
3.3. Extraction d'ARN	26
3.3.1. Principe.....	26
3.3.2. Méthode.....	26
3.4. Synthèse d'ADNc à partir d'ARN et PCR (RT-PCR)	27
3.4.1. Réverse transcription	27
3.4.1.1. Principe	27
3.4.1.2. Méthode	27
3.4.2. PCR (Polymerase Chain Reaction).....	27
3.4.2.1. Principe	27
3.4.2.2. Méthode	27
3.5. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	28
3.5.1. Principe.....	28
3.5.2. Méthode.....	28
3.6. Microscopie électronique à transmission.....	28
3.6.1. Principe.....	28
3.6.2. Méthode.....	29
3.7. Immunofluorescence.....	30
3.7.1. Principe.....	30
3.7.2. Méthode.....	30
3.8. Western Blot	31
3.8.1. Principe.....	31
3.8.2. Méthode.....	31
3.9. Zymographie	32
3.9.1. Principe.....	32
3.9.2. Méthode.....	33
3.10. Lysotracker et NAO.....	33
3.10.1. Le lysotracker	33
3.10.1.1. Principe	33
3.10.1.2. Méthode	34
3.10.2. NAO	34
3.10.2.1. Principe	34
3.10.2.2. Méthode	34
3.10.2.2.1. Les solutions utilisées	34
3.10.2.2.2. Protocole.....	34
3.11. Mesure de la respiration cellulaire par l'oxypolarographie (Hofhaus et al., 1993)	35
3.11.1. Principe.....	35
3.11.2. Méthode.....	35
3.12. Fractionnement complet par centrifugation différentielle.....	36
3.13. Centrifugation isopycnique en gradient continu de saccharose de la fraction MLP.....	37
3.14. Centrifugation isopycnique en gradient de Percoll.....	37

3.15. Centrifugation isopycnique en gradient de Nycodenz	37
3.16. Les enzymes de référence	38
4. Résultats et discussion	39
4.1. Résultats préliminaires	39
4.2. Caractérisation de l'outil.....	39
4.2.1. Détection du message de HYAL 1	39
4.2.1.1. Conditions techniques.....	40
4.2.1.2. Résultats et interprétation.....	40
4.2.2. Détection de la protéine par immunofluorescence.....	40
4.2.2.1. Conditions techniques.....	41
4.2.2.2. Résultats et interprétation.....	41
4.2.3. Détection de la protéine par immunoblotting	41
4.2.3.1. Conditions techniques.....	41
4.2.3.2. Résultats et interprétation.....	42
4.2.4. Recherche de l'activité hyaluronidasique	43
4.2.4.1. Conditions techniques.....	43
4.2.4.2. Résultats et interprétation.....	43
4.3. Impact de l'absence d'HYAL 1 sur les mitochondries	44
4.3.1. Marquage des mitochondries	44
4.3.1.1. Conditions techniques.....	44
4.3.1.2. Résultats et interprétation.....	44
4.3.2. Mesure de la respiration mitochondriale	44
4.3.2.1. Résultats et interprétation.....	45
- Mesure du contrôle respiratoire :	45
- Mesure de la consommation d'oxygène sur des cellules non perméabilisées:	45
4.3.3. Dosage de la cytochrome oxydase.....	45
4.4. Impact de l'absence d'HYAL 1 sur les lysosomes.....	46
4.4.1. Marquage des vésicules acide au Lysotracker®	46
4.4.1.1 conditions techniques	46
4.4.1.2. Résultats et interprétation.....	46
4.4.2. Marquage en immunofluorescence des lysosomes	46
4.4.2.1. Conditions techniques.....	46
4.4.2.2. Résultats et interprétation.....	47
4.4.3. Western blot Marquage	46
4.4.3.1. Conditions expérimentales.....	46
4.4.3.2. Résultats et interprétation.....	46
4.4.4. La coloration de Gomori en MET.....	48
4.4.4.1. Résultats et interprétation.....	48
4.4.5. Dosages des enzymes lysosomales	48
4.4.5.1. Résultats et interprétation.....	48
4.5. Etude de l'équipement enzymatique des différents organites par centrifugations.....	49
4.5.1. Fractionnement complet des MEFs ++ et des MEFs -/-.....	50
4.5.2. Analyse de la densité des organites des MEFs ++ et des MEFs -/- par centrifugation isopycnique et migration sur des gradients.	51
4.5.2.1.gradient saccharose.....	51
4.5.2.2.Gradient nycodenz	52
4.5.2.3.Gradient nycodenz	52
5. Conclusions et perspectives	54
6. Bibliographie.....	59

1. Introduction

1.1. L'acide hyaluronique (HA) ou hyaluronan

1.1.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques

L'HA est un polymère faisant partie de la famille des glycosaminoglycans (GAGs) ou mucopolysaccharides (MPS). Il est composé de disaccharides répétés d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine. Ces saccharides sont liés entre eux par des liaisons glycosidiques β 1-3 et β 1-4 (**Figure 1.1**). Le nombre de disaccharides peut varier de 2 000 à 2 5000 unités, ce qui correspond à une masse moléculaire relative de 10^5 à 10^7 Da. La longueur de ce polymère est comprise entre 2 et 25 micromètres. L'hyaluronan possède des propriétés hydrodynamiques, plus spécialement une certaine viscosité et une capacité à retenir l'eau.

L'HA est chargé négativement et possède des parties hydrophobiques dues aux groupes carboxyles de l'acide glucuronique et aux atomes d'hydrogène présents sur une face du disaccharide. Bien que l'HA fasse partie de la famille des GAGs, laquelle inclut l'héparan sulfate, le dermatan sulfate et la chondroïtine sulfate (CS), il diffère de ceux-ci de différentes façons. En effet, les GAGs sont habituellement fabriqués, comme les protéoglycans, dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et sont sécrétés via des voies similaires aux autres glycoprotéines, tandis que l'HA est synthétisé en membrane plasmique comme un polysaccharide et non modifié par la voie enzymatique (ceci sera précisé dans le paragraphe "les hyaluronan synthases"). Pour finir, l'HA ne possède pas de sulfate contrairement aux autres GAGs (Toole *et al.*, 2004).

1.1.2. Localisations et rôles de l'acide hyaluronique

L'HA est présent en abondance dans la matrice extracellulaire (MEC), en particulier dans les tissus embryonnaires et cancéreux. On le trouve également à l'intérieur de la cellule au niveau du cytoplasme, du noyau et des nucléoles (Evanko and Wight, 1999).

Les rôles biologiques connus de l'HA sont très variés. Il intervient dans:

- la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire durant le développement embryonnaire ;
- les tissus interstitiels où il a un rôle structurel et mécanique ;
- les articulations où il sert de lubrifiant ;
- l'humeur vitrée où on ne le trouve pas sous forme de gel mais plutôt sous forme d'un réseau très structuré (**Figure 1.2**) ;
- la cicatrisation des plaies (Longaker *et al.*, 1991, Chen *et al.*, 1999).
- etc.

L'HA a été identifié comme intervenant dans les mécanismes d'invasion tumorale et de propagation de métastases. Ainsi, on observe des taux élevés d'HA autour des cellules tumorales dans les cancers du colon, de la prostate, des reins, etc (Zhang *et al.*, 1995 ; Toole *et al.*, 2002 ; Lokeshwar *et al.*, 2005).

Dans les tissus tumoraux, l'HA faciliterait les métastases en ouvrant des espaces pour la migration des cellulaires tumorales et en permettant aux cellules tumorales d'interagir via les récepteurs du HA qui se trouvent sur la surface cellulaire, comme le CD44.

De plus, le manteau d'HA entourant les cellules tumorales causerait une perte partielle du contact lors de la croissance et la migration et offrirait une protection contre la surveillance immunitaire.

La concentration d'HA dans la circulation sanguine varie rapidement en réponse à un stress aigu, à un choc, à une septicémie, etc. Toutes ces augmentations supposent l'existence d'un mécanisme de régulation rapide de sa synthèse et de sa dégradation. D'où l'importance des hyaluronidases, des synthases et des éléments du contrôle de ce mécanisme (Csoka *et al.*, 2001).

1.1.3. Synthèse de l'acide hyaluronique

L'HA est synthétisé au niveau de la face externe de la membrane plasmique ; son élongation se produit du côté de l'extrémité réduite. Ce travail est effectué par les hyaluronan synthases (HAS) qui participent à la formation de l'HA en associant l'acide uridine diphospho-glucuronique et l'uridine diphospho-N-acétylglucosamine, formant ainsi une unité primaire d'HA à laquelle on ajoute au fur et à mesure un sucre (Weigel, 1997). Les HAS sont des glycosyltransférases qui agissent chez les vertébrés, les bactéries et les virus (DeAngelis, 1999). Il existe chez les mammifères trois types de HAS : Has 1, Has 2 et Has 3, qui produisent des polymères d'HA de tailles légèrement différentes, avec des efficacités variables (**Figure 1.3.**). Has 2, par exemple, jouerait un rôle dans le développement embryonnaire, et Has3 produirait des chaînes d'HA de plus petite taille ($\sim 2.10^5$ Da).

1.1.4. Catabolisme de l'acide hyaluronique

Le catabolisme de l'HA n'a pas encore été totalement expliqué. Cependant, plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet, notamment celle de Csoka *et al.* proposée en 2001 (**Figure 1.4.**). Selon ces auteurs, la dégradation de l'HA passerait par une dépolymérisation progressive effectuée par différentes hyaluronidases, surtout Hyal 1 et Hyal 2, agissant de concert pour dégrader ce substrat (les hyaluronidases sont présentées en détail dans la suite de l'Introduction). L'HA de haut poids moléculaire serait attaché à la surface de la membrane plasmique par des récepteurs à HA comme le CD44. Ces récepteurs provoqueraient son endocytose et c'est dans les endosomes que l'enzyme Hyal 2 ancrée à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol (GPI) dégraderait l'HA en fragments d'environ 20 kDa. Dans ce modèle, Hyal 1 prend le relais et, accompagnée d'autres enzymes (β -exoglycosidases, β -glucuronidase, β -N-acétylglucosamidase), dégrade l'HA en tétrasaccharides.

1.1.5. Récepteurs de l'acide hyaluronique

Les récepteurs de l'HA sont des protéines appelées hyaladhérines. On les retrouve au niveau de la surface cellulaire et de la matrice extracellulaire. On a pu en identifier plusieurs, tels que: CD44, RHAMM, LYVE-1, LEC, HARE, Layilin. Les plus importants sont le CD44 et RHAMM (**Figure 1.5.**).

Le CD44 (Cluster of Differentiation 44) est un récepteur glycoprotéinique de 85 kDa qui est situé à la surface de cellules saines mais également sur des cellules tumorales. Il contient un domaine transmembranaire, un ectodomaine et un domaine cytoplasmique (**Figure 1.6.**). Il existe plusieurs isoformes de ce récepteur. Bien qu'on ne connaisse pas encore exactement les implications de toutes ces formes, CD44 est sans doute le principal récepteur de l'HA (Stern *et al.*, 2003; Toole *et al.*, 2004).

Le RHAMM (Receptor for hyaluronic-acid mediated motility) intervient également dans le processus tumoral. Une hypothèse suggère que RHAMM amènerait l'HA à l'intérieur du cytoplasme et induirait ainsi l'apoptose (Toole *et al.*, 2004).

1.2. Les hyaluronidases

Les hyaluronidases sont une famille d'endoglucosaminidases qui dégradent l'HA. Certaines dégradent aussi la chondroïtine-4-sulfate et la chondroïtine-6-sulfate (Frost, 2000).

Des hyaluronidases jouent un rôle crucial dans la propagation des infections bactériennes et des toxines présentes dans des venins. Comme l'HA, elles pourraient également être impliquées dans la propagation de cancers (invasion des tumeurs, propagation des métastases).

Il a été proposé que les hyaluronidases somatiques et celles des venins de nombreuses espèces (serpents, scorpions, araignées...) proviendraient d'une même origine, à savoir l'appareil génital masculin. En effet, la plupart de ces hyaluronidases ont une séquence qui possède 30 à 40 % d'identité avec le PH-20, hyaluronidase du spermatozoïde. De façon étonnante, un grand nombre de protéines se trouvant dans l'éjaculat sont homologues avec des protéines de venins.

1.2.1. Classifications des hyaluronidases

On regroupe les hyaluronidases en trois classes distinctes basées sur différentes analyses biochimiques (Meyer and al., 1971) :

- Les hyaluronidases bactériennes sont des endo- β -acétyl-hexosaminidases. Elles dégradent l'HA et certaines CS. On les appelle parfois "hyaluronate lyases" par opposition aux hydrolases des deux groupes suivants.
- Les hyaluronidases de certains parasites et crustacés sont des endo- β -glucuronidases : elles coupent les liens $\beta(1-3)$, générant des tétrasaccharides et des hexasaccharides avec un acide glucuronique à l'extrémité non réduite.
- Les hyaluronidases des mammifères génèrent des produits tétra-et hexasaccharidiques qui seront dégradés totalement par la β -glucuronidase et la N-acétylglicosaminidase. Les hyaluronidases de mammifères possèdent aussi une affinité plus limitée pour la CS et le dermatan sulfate.

Il existe également un deuxième type de classification basé sur le pH d'activité. Dans le groupe des hyaluronidases actives à pH neutre, on trouve les hyaluronidases testiculaires, de venin et de bactéries, tandis que les hyaluronidases du sérum et lysosomales ont un pH d'activité acide (Fischer *et al.*, 1984).

1.2.2. Les hyaluronidases de certains tissus et organes

La présence de certaines hyaluronidases a été signalée dans de nombreux tissus et organes. Ainsi, le foie et les reins sont les organes majeurs pour la dégradation de l'HA présent dans la circulation. Les cellules hépatiques et rénales possèdent des récepteurs spécifiques pour l'HA. Les hyaluronidases sont également exprimées dans les ganglions lymphatiques où elles dégradent 90 % de l'HA avant qu'il ne rejoigne le flux sanguin. Enfin, les hyaluronidases de la peau agissent à un pH de 3,7 tandis que celles du sperme agissent à un pH neutre.

1.2.3. Les hyaluronidases humaines

Chez les humains, six gènes d'hyaluronidases ont été identifiés au total sur deux chromosomes différents: HYAL 1, HYAL 2 et HYAL 3 se trouvent rassemblés sur le locus 3p21.3, tandis que PH20/SPAM (Sperm Adhesion Molecule-1), HYAL 4 et HYALP1 se localisent sur le chromosome 7q31.3 (**Figure 1.7.**). A l'exception peut-être d'HYAL 4 et de HYALP1, toutes les autres hyaluronidases dégradent l'HA. La structure génomique des hyaluronidases est résumée dans la **Figure 1.8.**

1.2.3.1. *Hyal 1*

1.2.3.1.1. *Caractéristiques*

L'hyaluronoglucosaminidase-1 ou Hyal 1 est la première hyaluronidase à avoir été purifiée à partir du plasma humain, par une chromatographie échangeuse d'ions, à une concentration de 60 ng/ml. Sa purification a nécessité l'utilisation de triton X-114, ce qui signifie que la protéine se situe dans un environnement lipophile. Le gène de cette hyaluronidase du plasma a été séquencé puis utilisé pour le clonage (Frost *et al.*, 1997). Ce gène est appelé HYAL 1.

HYAL 1 est un gène de 2507 kb se trouvant sur le chromosome 3p21.3. Il code pour une protéine de 435 acides aminés qui est identique à 40 % à l'hyaluronidase du spermatozoïde, PH-20. A la différence de celle-ci, Hyal 1 est exprimée dans de multiples tissus. On a pu mettre en évidence deux isoformes de cette enzyme: une dans le plasma et l'autre dans l'urine. L'Hyal 1 plasmatique est une protéine de 57 kDa composée d'une simple chaîne polypeptidique de 49 kDa. Suite aux modifications post-traductionnelles, 8 kDa supplémentaires sont apportés par les glycosylations. Dans l'urine, on trouve la protéine de 57 kDa ainsi qu'un fragment endoprotéolytique de 45 kDa (**Figure 1.9.**). L'urine contient une activité hyaluronidasique spécifique cent fois plus élevée que le plasma (Ginetzinsky *et al.*, 1958).

Hyal 1 est abondante au niveau des organes parenchymateux comme le foie, les reins, la rate, le coeur, les poumons et le placenta, mais semble absente du cerveau. C'est dans le foie qu'on en trouve la plus grande quantité (Frost *et al.*, 1997).

De nombreux arguments laissent penser que Hyal 1 serait une enzyme lysosomale et qu'elle représente la protéine responsable de l'activité hyaluronidasique mesurée à plusieurs reprises dans cet organite subcellulaire. Cependant, il existe aussi différents contre-arguments : par exemple, comment se fait-il qu'une enzyme lysosomale puisse circuler librement dans le sang ? (Stern, 2003). Comment cela se fait-il que Hyal 1 ait un pH d'activité optimal de 3,8 alors que le pH lysosomal tourne autour de 4,5 ?

1.2.3.1.2. *Fonctions*

Hyal 1 clive les liaisons β 1-4 de l'HA. Elle semble agir aussi sur la CS mais d'une façon limitée. Dans la CS, la N-acétyl-glucosamine est remplacée par une N-acétyl-galactosamine.

1.2.3.1.3. *HYAL 1 et cancer*

Le gène HYAL 1 est aussi appelé LUCA-1 (LUNG CAncer-1), un possible suppresseur tumoral souvent délété dans les cellules cancéreuses pulmonaires. De même des carcinomes de cellules squameuses de la tête et du cou présentent fréquemment une mutation hétérozygote dans le locus LUCA-1 (Wei et al., 1996). En revanche, on a montré une surexpression de HYAL 1 dans d'autres lignées tumorales invasives (reins, prostate) ainsi que dans les cancers de la prostate et de la vessie (Lokeshwar et al., 2005). D'ailleurs, lorsqu'on inhibe l'expression de Hyal 1 dans les cancers de la vessie, on observe une réduction de leur caractère invasif.

1.2.3.1.4. *HYAL1 et pathologies*

Un syndrome résultant d'une mutation dans Hyal 1 a été identifié par Natowicz *et al.* en 1996. Il a été nommé mucopolysaccharidose de type IX (voir "les maladies de surcharge lysosomales").

1.2.3.2. *Hyal 2*

Hyal 2 est une autre hyaluronidase active à pH acide qui est encodée par un gène adjacent au site HYAL1. Elle est ancrée à la membrane plasmique par une liaison GPI bien qu'une partie soit soluble. Hyal 2 clive l'HA de haut poids moléculaire en un produit de taille limite de 20 kDa (ou environ 50 disaccharides).

D'autre part, Hyal 2 semble agir parfois comme un oncogène. En effet, il a été montré que la surexpression d'Hyal 2 accélérât la formation de tumeurs de cellules astrocytaires de souris (Novak *et al.*, 1999) mais aussi qu'elle accélérât l'apoptose (Chang *et al.*, 2002). Hyal 2 est un récepteur de la surface cellulaire pour certains rétrovirus (Rai *et al.*, 2001).

1.2.3.3. *Hyal 3*

Cette hyaluronidase a été mise en évidence à la suite d'analyses sur la moëlle osseuse et les testicules de mammifères, mais elle reste méconnue.

1.2.3.4. *L'hyaluronidase testiculaire, PH-20/SPAM*

La PH-20/SPAM-1 est historiquement la première hyaluronidase découverte. Cette protéine multifonctionnelle liée à une ancre GPI joue plusieurs rôles dans la fertilisation (Cherr *et al.*, 2001). Son gène est conservé chez différentes espèces comme la souris, le rat, le macaque, le taureau et l'humain. Il est abondamment exprimé dans les testicules.

Le SPAM a d'abord été trouvé à la fois au niveau de la membrane plasmique et de la membrane acrosomale interne. C'est une simple chaîne glycoprotéinique avec une ancre GPI mesurant 64 à 68 kDa et une activité optimale à pH neutre (Martin-DeLeon, 2006). L'HA peut se lier à la PH-20/SPAM par l'intermédiaire d'un site distinct du site catalytique. Cette réaction entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, facilitant l'attachement du spermatozoïde à la zone pellucide (Cherr *et al.*, 2001).

1.2.3.5. *Hyal 4*

L'expression de Hyal 4 se limite au placenta et aux muscles squelettiques. Des études préliminaires indiquent que cette protéine possède une activité chondroïtinase mais pas hyaluronidasique. C'est la première chondroïtinase à avoir été identifiée dans des tissus de vertébrés.

1.2.3.6. *HyalP1*

HyalP1 est un pseudogène chez les humains parce qu'il existe deux délétions qui causent une terminaison prématurée (Csoka *et al.*, 1999). Il pourrait cependant encoder pour une enzyme hyaluronidase chez la souris.

1.2.4. Les hyaluronidases de la souris

Les gènes orthologues de la souris à l'humain, ont été trouvés sur les régions du chromosome 9 F1-F2 et 6 A2 (Csoka *et al.* 1998). Le degré d'homologie entre les paires orthologues chez l'humain et la souris est beaucoup plus grand qu'entre les six paralogues humains (**Figure 1.10.**). On en conclut que les divergences entre les paralogues doivent s'être produites longtemps avant la divergence de ces espèces, il y a approximativement 80 millions d'années. Les enzymes Hyal 1, Hyal 3, Hyal 4 et HyalP1 de la souris possèdent respectivement 73%, 80%, 77% et 68% d'identité avec la séquence humaine correspondante.

1.3. Les lysosomes

1.3.1. Définition

En 1955, le professeur De Duve a mis pour la première fois en évidence la présence de lysosomes au niveau du foie de rat (De Duve *et al.*, 1955). Dans cette découverte, la biochimie devance la morphologie et suggère l'existence d'un organe intracellulaire qui sera confirmé par la suite par un examen morphologique.

Les lysosomes sont les principaux sites intracellulaires pour la dégradation des macromolécules y compris les protéines, les hydrates de carbone et les acides nucléiques, mais également celle des “vieux “ organites comme les mitochondries.

Un lysosome est riche en hydrolases acides, lesquelles requièrent un environnement acide pour leur activité. Chaque lysosome présente une membrane spécialisée qui intervient dans le transport sélectif des produits de dégradation vers le cytoplasme grâce aux protéines lysosomales membranaires. Dans cette membrane, une pompe ATPase à protons consomme de l'ATP pour établir le pH acide dans la lumière de l'organite. Les protéines présentes dans les membranes lysosomales sont particulièrement glycosylées, ce qui, pense-t-on, permet probablement de les protéger des protéases présentes dans leur lumière.

1.3.2. Composition de la membrane des lysosomes

Les lysosomes possèdent de nombreuses protéines membranaires. Toutefois, on ne connaît pas beaucoup leur processus d'action. A ce jour, les protéines lysosomales membranaires les plus connues sont les LAMPs (lysosome-associated membrane proteins) et les LIMPs (lysosomal integral membrane proteins), les pompes à proton H⁺-ATPases et certains transporteurs membranaires comme ceux de la sialine et de la cystinosine (Eskelinen *et al.*, 2003).

1.3.3. Les voies de transport des matériaux à digérer

Les lysosomes sont les endroits vers lesquels convergent plusieurs voies de trafic intracellulaire. Tandis que les enzymes lysosomales y parviennent par une voie qui dérive du RE via l'appareil de Golgi (voir “Biogenèse des enzymes lysosomales”), les macromolécules à dégrader peuvent rejoindre les lysosomes par trois voies majeures (**Figure 1.11.**):

- la phagocytose,
- l'autophagie,
- et l'endocytose

1.3.3.1. *L'endocytose*

L'endocytose permet à la cellule d'intégrer des substances exogènes qui seront logées dans les vésicules, dites endosomes, dont la membrane limitante dérive d'une sélection de composants de la membrane plasmique de la cellule.

1.3.3.2. *La phagocytose*

La phagocytose est un processus où une grosse vésicule appelée phagosome se forme autour des micro-organismes ou des débris cellulaires et permet leur ingestion.

1.3.3.3. *L'autophagie*

L'autophagie est un processus catabolique non sélectif par lequel du matériel cytoplasmique est séquestré à l'intérieur d'un organe formé par des membranes provenant entre autres du RE. Cet organe chargé est ensuite transféré, par fusion, aux lysosomes où son contenu sera dégradé. C'est le principal mécanisme pour la dégradation des protéines lorsque la cellule se trouve par exemple en condition de famine (Seglen, 1987). Plusieurs enzymes peuvent être séquestrées autophagiquement, comme la lactate déshydrogénase (LDH), la glucokinase et l'aldolase.

1.3.4. La biogenèse des enzymes lysosomales

1.3.4.1. *Introduction*

La majorité des enzymes lysosomales synthétisées sont couplées à un signal de reconnaissance mannose-6-phosphate (M6P). Elles sont transportées du *trans*-Golgi aux endosomes précoces et/ou tardifs après avoir été reconnues par les récepteurs du M6P (MPR). Ces récepteurs interagissent avec des protéines adaptatrices qui médient la sortie des complexes MPR-hydrolases acides du *trans*-Golgi dans des vésicules entourées d'un manteau de clathrine (**Figure 1.12.**).

Dans les endosomes, les hydrolases se dissocient des MPRs en réponse au pH plus acide et sont, par la suite, libérées dans les lysosomes tandis que les récepteurs MPRs retournent dans le Golgi (ou au niveau de la membrane plasmique) où ils seront réutilisés.

1.3.4.2. *Le trafic intracellulaire*

1.3.4.2.1. *Le réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique est le site de la synthèse des protéines destinées à la membrane plasmique, ainsi qu'aux organites tels que le réticulum lui-même, l'appareil de Golgi et les lysosomes. Chaque protéine nouvellement synthétisée possède une séquence signal à son extrémité amino-terminale qui va permettre sa reconnaissance et l'initiation de son transport vectoriel à l'intérieur du RER. Les enzymes lysosomales, tout comme la plupart des protéines membranaires et sécrétoires, subissent une glycosylation co-traductionnelle du résidu asparagine (c'est à dire l'addition d'hydrate de carbone sur le groupement amine de certains résidus asparagine). Cette étape de glycosylation implique le transfert en bloc d'oligosaccharides préformés (trois résidus de glucose, neuf résidus de mannose et deux résidus de N-acétylglucosamine). Une fois dans la lumière du RER, ce signal peptidique est modifié par l'excision de trois glucoses et d'un des neuf mannoses de l'oligosaccharide. Les protéines ainsi modifiées sont envoyées par transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi (Kornfeld, 1987).

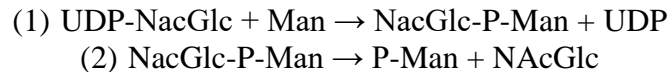
1.3.4.2.2. *L'appareil de Golgi*

Les enzymes lysosomales rejoignent le *cis*-Golgi. Elles vont traverser les différentes “citernes” jusqu’au *trans*-Golgi d’où elles seront ensuite adressées aux lysosomes. Le long de leur passage à travers cet organite, les enzymes vont subir des modifications biochimiques telles qu’un remaniement de l’oligosaccharide qui leur a été associé. Ces remaniements conduisent à la formation d’oligosaccharides complexes qu’on retrouvera au niveau des membranes plasmiques, de l’appareil de Golgi et des lysosomes (**Figure 1.13.**).

Une autre modification cruciale pour la reconnaissance des protéines lysosomales se déroule également dans le *trans*-Golgi : c’est l’acquisition d’un M6P. Ce “marqueur” est généré en deux étapes.

La première est l’addition d’un N-acétylglucosamine phosphate (NacGlcP) provenant d’un nucléotide glucidique, UDP-N-acétylglucosamine, au résidu mannose. Cette addition est catalysée par la N-acétylglucosamine phosphotransférase.

La seconde étape, médiée par la N-acétylglucosamine-1-phosphodiester α -N-acétylglucosaminidase, hydrolyse le résidu GlcNac, empêchant ainsi le recouvrement de ce “marqueur” (Kornfeld, 1987 et 1999; Rohrer, 2001) :



Une fois ces modifications effectuées, les enzymes lysosomales sont transportées dans le *trans*-Golgi où elles seront reconnues par des glycoprotéines transmembranaires qu’on appelle récepteurs du mannose-6-phosphate. Ces récepteurs liés à leurs ligands sont alors extraits du Golgi par la formation de vésicules recouvertes de clathrine qui fusionnent ensuite avec les endosomes (**Figure 1.14.**).

Deux MPRs différents médient ce transport vers les lysosomes. Il s’agit de glycoprotéines de type I intégrales avec un poids moléculaire de 300 000 Da (MPR 300) et 46 000 Da (MPR 46). On a pu les localiser à de fortes concentrations dans le *trans*-Golgi, les membranes endosomales et la membrane plasmique (Braulke Thomas, 1996).

1.3.4.2.3. *Transport indépendant du mannose-6-phosphate*

Bien que la voie de reconnaissance du M6P soit une étape principale pour le ciblage des enzymes lysosomales, il existe d’autres mécanismes pour localiser les hydrolases acides indépendamment d’un signal de reconnaissance. Cela a été mis en évidence lors d’études sur des patients atteints d’une mucopolysaccharidose de type II. Cette maladie est caractérisée par une déficience en phosphotransférase qui rend incapable la synthèse du signal de reconnaissance M6P et donc la liaison avec son récepteur (Kornfeld, 1986). Cependant, ces patients présentent un taux d’hydrolase acide normal dans les hépatocytes, les leucocytes et les cellules de Kuppfer. A la suite de cette étude, on a pu mettre en évidence différents mécanismes de ciblage des enzymes lysosomales qui sont spécifiques à un ou des types cellulaires. L’un de ces mécanismes serait la présence d’un récepteur de 78 kDa qui est transporté du RER vers l’appareil de Golgi (Gonzalez-Noriega, 2006).

On a pu également observer que la cathepsine D utilisait un de ces mécanismes indépendant du M6P (Dittmer *et al.*, 1999).

1.3.4.2.4. La route de l'endosome au lysosome

Au cours de son parcours vers l'endosome, la vésicule d'endocytose perd son manteau de clathrine et fusionne rapidement avec d'autres vésicules dans un processus appelé la "fusion homotypique", formant ainsi un endosome précoce. Celui-ci possède un pH plus bas que la vésicule, aux alentours de 5,9-6,0. Ceci va permettre la séparation du MPR de son ligand. Le récepteur sera recyclé et retournera dans le *trans*-Golgi par les vésicules qui bourgeonnent de la surface de l'endosome. A ce moment, l'endosome est appelé endosome tardif.

Les endosomes tardifs sont formés à un pH continu allant de 5 à 6. Ils contiennent un lipide inhabituel appelé acide lysobisphosphatique (LBPA) inséré dans la membrane de l'endosome.

Ce lipide médie des interactions lipide-lipide et protéine-lipide (Kobayashi *et al.*). La fonction des endosomes est de dégrader certaines protéines et certains lipides. Cependant, ils ne sont pas capables de digérer tout le matériel.

La dernière étape, la fusion des endosomes tardifs et des lysosomes, crée ainsi un organite hybride. C'est à ce moment que LAMP est transmis au lysosome. Il devient ainsi un marqueur pour les lysosomes mais également pour les endosomes tardifs. La fusion commence après que les MPRs soient retournés au *trans*-Golgi.

1.3.5. Caractéristiques de certaines enzymes lysosomales

1.3.5.1. La β -galactosidase

La β -galactosidase est une enzyme intervenant dans de multiples métabolismes (Alpers *et al.*, 1969). Elle provoque la cassure hydrolytique du β -galactosyl et contribue à la maintenance de l'homéostasie (Renata Sano *et al.*, 2005).

1.3.5.2. La β -glucosidase

La β -glucosidase est une protéine membranaire périphérique qui catalyse l'hydrolyse du glucosylcéramide en β -glucose et en céramide en présence de la protéine modulatrice saposine C et de lipides (Lieberman *et al.*, 2007). La maladie de surcharge appelée maladie de Gaucher est due à des mutations dans la glucosidase acide. Ces mutations mènent à une activité biologique diminuée à cause d'un trafic affaibli, et à une altération de la stabilité de l'enzyme.

1.3.5.3. La β -hexosaminidase

C'est une enzyme qui réside dans le lysosome et qui participe à la dégradation des glycoprotéines, des glycolipides et des GAGs. Elle intervient dans l'hydrolyse de la liaison β terminale des résidus GlcNac et GalNac. Des mutations au niveau de ce gène mènent à une absence ou à une forme tronquée de l'enzyme qui provoque une maladie de surcharge lysosomale (MLS) avec accumulation du substrat. L'ensemble du système nerveux est endommagé (Neufeld, 1989).

1.3.5.4. La β -glucuronidase

La β -glucuronidase intervient dans la dégradation des protéoglycans dans les lysosomes. Une déficience génétique de l'enzyme conduit à une maladie de surcharge lysosomale connue comme la mucopolysaccharidose de type VII .

1.4. Les maladies de surcharge lysosomale

Les maladies de surcharge lysosomale sont caractérisées par une accumulation de macromolécules intralysosomales non digérées qui perturbe le bon fonctionnement de cet organe. Ces maladies peuvent être classées sur base de l'altération de la membrane lysosomale (modification de la perméabilité, absence de transporteur, etc.) ou de la matrice (déficits en enzymes lysosomales par exemple). On connaît à ce jour plus 40 types différents de maladies de surcharge lysosomale. Toutes ces maladies résultent d'un problème génétique qui provoque la déficience ou le dysfonctionnement de la protéine.

1.4.1. Les déficits du transport

Voici quelques exemples de déficit au niveau du transport :

- La cystinose est une maladie autosomale récessive caractérisée par l'accumulation intralysosomale de cystine. Le gène défectueux encode pour un transporteur de 367 acides aminés appelé cystinosine.
- La maladie de Salla est une maladie qui touche un transporteur membranaire, la sialine. Le sialine est une protéine de 495 acides aminés.

1.4.2. Les déficits enzymatiques

Ces déficits sont généralement classés en trois groupes majeurs se référant à la nature chimique des matériaux accumulés (Brady R.O. and al, 1968):

- Les surcharges en lipides (ex. : maladie de Gaucher, de Nieman-Pick).
- Les surcharges en mucopolysaccharides.
- Les surcharges en glycogène (ex. : maladie de Fabry).

Il existe également des maladies non classées, par exemple celles dont la fréquence est extrêmement rare et celles qui ont une surcharge trop complexe.

Dans le cadre de ce mémoire, ce sont les surcharges en mucopolysaccharides qui vont nous intéresser car un déficit en Hyal 1 pourrait aboutir à ce genre de problème.

1.4.3. La mucopolysaccharidose du type IX

1.4.3.1. Généralité sur les mucopolysaccharidoses

Les mucopolysaccharidoses sont dues à un déficit en enzymes qui dégradent des glycosaminoglycans ou des mucopolysaccharides. Ceux-ci sont formés d'unités disaccharidiques dont chacune contient un dérivé d'un aminohexose, habituellement de la D-glucosamine ou de la D-galactosamine. Au moins un des deux sucres contient un groupe acide possédant une charge négative à pH 7,0. Il s'agit généralement d'un carboxyle ou d'un sulfate.

En fonction de l'enzyme déficiente, c'est le catabolisme du dermatan sulfate, de l'héparan sulfate, du kératan sulfate, des chondroïtines sulfates ou de l'HA qui sera bloqué de façon isolée ou en combinaison. L'accumulation des GAGs dans les tissus entraîne un syndrome de surcharge avec dysfonction tissulaire. Les GAGs sont excrétés dans les urines. L'analyse de celle-ci permettra donc d'identifier le dysfonctionnement qui sera ensuite confirmé par des études enzymologiques et de biologie moléculaire (Van Hoff).

A ce jour, on a pu identifier différents types de mucopolysaccharidoses. La dernière en date, identifiée par Natowicz *et al.* en 1996, a été appelée « de type IX ». Elle est due à un déficit de l'enzyme Hyal 1 qui provoque l'accumulation d'HA dans des tissus et dans la circulation sanguine. C'est une maladie autosomale récessive.

1.4.3.2. *La mucopolysaccharidose du type IX*

Un seul patient atteint de cette maladie a été décrit. Son phénotype clinique est surprenant car il ne ressemble pas à ceux des autres mucopolysaccharidoses. Le patient présente un certain retard de croissance (P5), des masses de tissus souples péri et intra-articulaires, une petite stature, mais pas d'anomalie neurologique ou viscérale. Il possède également des traces de dysmorphisme facial. Il semble que la pathologie soit limitée à des tissus spécifiques (Triggs-Raine *et al.* 1999).

Un examen histologique montre une accumulation d'histiocytes près des zones impliquées. Le sérum est déficient en activité hyaluronidasique et les concentrations d'HA dans le sérum sont excessivement élevées, de 38 à 90 fois la normale (Natowicz, *et al.*, 1996). Natowicz en 1996 suggère que cette accumulation d'agrégats nodulaires d'histiocytes autour et dans les jonctions articulaires pourrait être le résultat d'un échec au niveau de la dégradation de l'hyaluronan par l'hyaluronidase. La prédominance d'histiocytes à ces sites pourrait être le résultat d'une agrégation des macrophages induite par l'acide hyaluronique.

1.4.3.3. *Caractéristiques génétiques*

Le patient atteint de mucopolysaccharidose IX présentait deux mutations de Hyal1 : une substitution d'acide aminé non conservative sur un allèle (G1412A, substituant une lysine pour un acide glutamique en position 268, dans un site actif potentiel) et un réarrangement intragénique complexe sur l'autre allèle : délétion de 37 pb en position 1361 et insertion d'une séquence de 14 pb, induisant un codon stop prématuré. Ce réarrangement résulterait probablement d'une sorte de glissement et de mauvais alignement commençant à l'acide aminé 250 et se terminant 19 résidus en amont. Ce réarrangement provoquerait l'inactivation de l'enzyme ainsi que l'accumulation d'HA dans les tissus.

1.5. Les mitochondries

1.5.1. Définition

Le mot mitochondrie dérive du grec *mitos*, « filament », et *chondros*, « graine », en raison de l'aspect de cet organite au microscope optique et électronique. En effet, dans les cellules élaboratrices d'hormones stéroïdiennes (corticosurrénales et gonades), les mitochondries sont filamenteuses, alors que dans les hépatocytes, elles sont granulaires.

Les mitochondries ont un diamètre d'environ 1 μm . Elles sont abondantes : leur nombre est estimé à 1000 dans un hépatocyte de rat. Les mitochondries ne sont pas des organites statiques: elles se scindent ou au contraire fusionnent couramment, ce qui explique leur polymorphisme au sein d'une même cellule

On suppose que la mitochondrie naquit lorsque deux bactéries, archéobactérie anaérobie (hôte) d'une part et protobactérie aérobie (symbionte) d'autre part, fusionnèrent (il y a quelques milliards d'années) pour donner un eucaryote primitif duquel tous les eucaryotes actuels dériveraient.

Nous nous proposons de développer un ou deux points particuliers relatifs aux mitochondries, en relation avec les expériences effectuées dans ce travail. Le développement qui suit est donc volontairement restreint.

1.5.2. Composition

1.5.2.1. *La structure mitochondriale*

La mitochondrie est limitée par une enveloppe formée de deux membranes: la membrane externe et la membrane interne, séparées par un espace intermembranaire (**Figure 1.15.**). La membrane externe est perméable à toutes les molécules de poids moléculaire ≤ 5 kDa, grâce à la présence de porines. Elle contient aussi des translocases, transporteurs protéiques impliqués dans l'importation des protéines. La membrane interne délimite l'espace matriciel. Elle se replie pour former de nombreuses crêtes (cristae), ce qui amène à augmenter sa surface totale. Les crêtes se présentent selon différentes formes: tubulaire, sacculaire, laminaire et triangulaire, qui peuvent co-exister dans la même mitochondrie et évoluer avec le temps. Les molécules intervenant dans la chaîne du transport des électrons s'organisent dans les crêtes.

La composition lipidique de la membrane interne est particulière : elle contient une majorité de phosphatidylcholines et de cardiolipines. Dans cette membrane on trouve la chaîne respiratoire de transporteurs d'électrons, l'ATP synthase et de nombreux transporteurs qui assurent le passage d'éléments tels que pyruvate, acide gras, ATP, ADP et HPO, composés nécessaires à la production d'ATP. La membrane interne contient aussi des translocases (Translocase of the Inner Membrane, TIM) impliquées dans l'importation des protéines.

Dans l'espace matriciel, on trouve un mélange très concentré de nombreuses enzymes, dont celles nécessaires à l'oxydation du pyruvate et des acides gras (en acétyl-CoA) dans le cycle de Krebs. Cet espace renferme également plusieurs copies identiques d'ADN (génom mitochondrial) et les protéines nécessaires à la transcription de celui-ci puis à la traduction de l'ARNm en protéines. La protéosynthèse mitochondriale ne concerne cependant qu'un nombre restreint de protéines (13), la grande majorité des protéines mitochondriales (environ 300 protéines différentes) étant importée à partir du cytoplasme, notamment grâce aux complexes TOM et TIM (Logan, 2006).

1.5.2.2. *L'ADN mitochondrial*

L'ADN mitochondrial est circulaire et est ponctué de structures appelées nucléoïdes. Chaque nucléoïde contient 4 à 5 copies de l'ADN mitochondrial (mrDNA). Il encode pour des protéines telles que les sous-unités de la cytochrome oxidase, les sous-unités de la F₀ ATPase, la sous-unité de l'apocytochrome b de la CoQH₂-Cytochrome C réductase et les sous-unités de la NADH-CoQ réductase (Magalhaes, PJ et al., 1998).

1.5.3. La respiration mitochondriale

1.5.3.1. *Introduction*

Les mitochondries participent à :

- la production d'ATP, qui résulte notamment de la glycolyse et du cycle de Krebs. Le rôle principal du cycle de Krebs est de fournir des électrons qui vont alimenter la chaîne respiratoire se trouvant dans les crêtes mitochondriales (**Figure 1.16.**).
- la synthèse de stéroïdes hormonaux.
- le turnover de monoamines (neurotransmetteurs).
- la séquestration de Ca²⁺.
- et la mort cellulaire programmée (apoptose) par fuite de cytochrome c dans le cytoplasme.

1.5.3.2. *La chaîne du transport d'électrons*

La chaîne de transport des électrons se trouve dans la membrane interne de la mitochondrie. Les électrons se déplacent le long d'un flux allant de molécules à faible potentiel d'oxydoréduction vers les molécules possédant un potentiel fort, plus précisément du NADH à l'oxygène moléculaire. Quatre complexes se trouvent sur cette chaîne et vont capturer les électrons : NADH-quinone oxydoréductase (complexe I), succinate-quinone oxydoréductase (complexe II), quinol-cytochrome c oxydoréductase (complexe III ou bc₁), et cytochrome c oxydase (complexe IV).

La chaîne des électrons contient également l'ubiquinone, qui se trouve dans l'épaisseur de la membrane interne (molécule lipophile) et transporte les électrons (et protons) du complexe II au complexe III, ainsi que le cytochrome c qui se trouve dans l'espace intermembranaire où il établit une navette d'électrons entre complexes III et IV. Les électrons sont portés de complexe en complexe par l'ubiquinone et le cytochrome c. Simultanément, des protons sont transloqués vers l'espace intermembranaire, créant un gradient de concentration en protons de part et d'autre de la membrane (Logan, 2006)

1.5.3.3. L'ATP synthase (F₀F₁)

En présence du gradient de protons établi entre les deux faces de la membrane mitochondriale interne et en absence de concentrations élevées ATP dans la matrice, l'ATP synthase laisse passer les protons au niveau du domaine membranaire F₀, un passage qui permet la production d'ATP par le domaine F₁. Plus précisément, chaque sous-unité α du domaine F₁ de la protéine couple rapidement l'ADP et le Pi en produisant l'ATP. C'est le potentiel de membrane et le passage des protons qui en résulte (« source d'énergie »), qui permet l'expulsion de l'ATP vers l'espace matriciel au cours d'un mouvement de rotation de la sous-unité γ dans le domaine F₁. La place de l'ATP est immédiatement prise par un nouvel ADP + Pi. Douze protons sont nécessaires pour la production de 3 ATP.

1.5.3.4. Bilan final de la chaîne respiratoire

Le bilan final de l'oxydation complète d'une molécule de glucose fournira 30 molécules d'ATP, tandis qu'une molécule d'acide gras, comme le palmitate (C₁₆), fournira 120 molécules d'ATP.

1.5.4. Caractéristiques des enzymes mitochondriales étudiées dans le cadre du mémoire

1.5.4.1. *La cytochrome oxydase*

La cytochrome oxydase fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire. Elle catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'oxygène en eau au moyen de 4 électrons. Le transfert des électrons est irréversible, contrairement à celui des complexes I et III. Ce transfert d'électrons est associé à un efflux de protons vers l'espace intermembranaire.

2. Buts et démarche du mémoire

L'acide hyaluronique est un GAG présent dans la matrice extracellulaire entourant les cellules des tissus de vertébrés. Il participe à la prolifération, la migration et la différenciation cellulaires ainsi qu'au développement des cancers (Toole, 2001). Sa dégradation enzymatique résulte de l'action des hyaluronidases. On peut donc supposer que ces hydrolases jouent un rôle crucial dans les processus ci-dessus. Cependant, les fonctions des principales hyaluronidases, HYAL1 et HYAL 2, restent relativement méconnues.

HYAL 1 est certainement impliquée dans la dégradation de l'HA dans les tissus (Stern, 2004). Une surexpression de HYAL 1 a été constatée dans plusieurs cancers dont celui de la prostate (Lokeshwar *et al.*, 2001) et du rein. L'absence de HYAL 1, qui n'a été observée que chez un seul individu humain jusqu'à présent, conduit à une maladie de surcharge qui a été surnommée mucopolysaccharidose de type IX (Natowicz *et al.*, 1996). Cependant, le phénotype de cette personne (anomalies osseuses et présence de masses molles para-articulaires) ne correspond pas à celui d'une maladie de surcharge lysosomale classique. Des souris déficientes en HYAL 1 ont été générées dans deux laboratoires différents, l'un en Californie et l'autre au Canada. Selon des communications personnelles (aucune publication à ce jour), ces souris ne présentent pas de phénotype particulier. L'Unité de Recherche en Physiologie Moléculaire (URPhyM) a entamé une caractérisation biochimique de la localisation subcellulaire de HYAL 1 dans le foie de souris. Les premiers résultats (non publiés) suggèrent une localisation lysosomale atypique ainsi que la présence de l'enzyme dans des vésicules distinctes des lysosomes.

L'objectif de ce mémoire est d'observer les conséquences d'une disparition de HYAL 1 sur l'aspect et le comportement cellulaires. Pour effectuer cette étude, l'URPhyM dispose de cellules embryonnaires fibroblastiques de souris (MEFs) provenant d'un modèle de souris KO (MEFs $-/-$) ainsi que de MEFs de souris sauvages (« wild type », WT ; MEFs $+/+$).

Une première observation en microscopie optique (MO) de ces deux types de cellules a permis de mettre en évidence une différence de morphologie : les cellules MEFs $-/-$ sont plus arrondies et contiennent des granules dans leur cytoplasme. Une analyse au microscope électronique (ME) a révélé la présence de grosses vésicules denses occupant une partie non négligeable du cytoplasme des MEFs $-/-$. Ce phénotype n'est pas retrouvé chez les MEFs $+/+$. Dès lors, nous décidons d'étudier certaines caractéristiques des organites des MEFs $-/-$, ce qui permettra peut-être d'apporter des informations nouvelles sur la fonction de HYAL 1.

La première étape du travail consiste à confirmer par RT-PCR, Western Blot, immunofluorescence et zymographie que les MEFs $-/-$ n'expriment pas HYAL 1, que ce soit au niveau du transcrit ou de la protéine. Ensuite, l'impact de la déficience en HYAL 1 est examiné en parallèle sur deux organites : les mitochondries et les lysosomes. Les techniques utilisées pour explorer les mitochondries sont : une mesure de la respiration mitochondriale par oxypolarographie, un marquage fluorescent spécifique du NAO, et une analyse biochimique de l'activité d'une enzyme mitochondriale.

L'analyse des lysosomes, quant à elle, fait également appel aux techniques de fluorescence (LysoTracker™), au marquage immunohistochimique de Lamp 1 et à l'analyse biochimique de plusieurs activités enzymatiques des lysosomes. Enfin, un marquage réalisé par la coloration de Gomori en ME devrait permettre d'observer les lysosomes dans le cytoplasme des cellules.

Ces résultats devraient nous fournir des précieux arguments pour émettre une hypothèse quant à l'implication de HYAL 1 dans les fonctions cellulaires.

3. Matériel et méthodes

3.1. Les MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts)

3.1.1. Cultures cellulaires des MEFs

Nous avons reçu des échantillons de fibroblastes embryonnaires de 14 jours de souris knockout pour l'hyaluronidase 1 (HYAL1) de Barbara Triggs-Raine [Strain Name: B6.129X1-*Hyal1*^{tm1Stn/Mmcd}]. Elles ont été immortalisées par l'insertion d'un virus SV40 (Virus Simien 40) codant la protéine virale appelée l'antigène grand T. L'antigène grand T va séquestrer les protéines p53 et pRb qui empêchent la prolifération illimitée des cellules. Ces MEFs font parti de la lignée C57 Black. On a également reçu des MEFs provenant de souris Wild Type. Elles appartiennent à la lignée C549 et ont également été immortalisées mais par sélection.

3.1.1.1. Description de la souris KO en HYAL1

On observe une prépondérance de descendance mâles suggérant que la lésion est plus sévère que la simple délétion du gène de l'enzyme. Les femelles homozygotes sont de morphologie plus petite que les homozygotes mâles. Cependant, certaines souris subissent une soudaine augmentation de croissance avant le stade de maturation qui leur permet de rattraper leur retard. La concentration en HA dans le sérum est supérieure à 40 fois la normale. Les souris présentent une très faible cicatrisation, leur pelage tend à tomber par plaque et on observe des anomalies vasculaires. Elles sont également particulièrement susceptibles aux infections.

3.1.1.2. Construction de l'altération génétique des KO

Cette construction a été effectuée par une recombinaison homologue du locus ciblé insérant un gène de résistance à la néomycine à l'intérieur de l'exon 1.

3.1.1.3. Méthode de culture des MEFs

Les MEF au génotype $-/-$ et $+/+$ sont cultivées à 37°C dans du DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) dans lequel on a ajouté 50 ml de Sérum de Veau Foetal (10%), 10 ml de mélange d'antibiotiques pen-strep à 10 000U/ml (pénicilline et streptavidine), 5 ml de ultraglutamine-1 200 mM (Cambrex®) et 5 ml de HEPES Buffer 1M.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes en plastique "Falcon" (75cm²). Elles adhèrent au plastique et s'y multiplient jusqu'à confluence. Ensuite, les cellules sont rincées avec 10 ml de HBSS (Hanks'balanced salt solution) et trypsiniées avec 5 ml d'une solution Trypsin/EDTA (Cambrex®) pendant 2 ou 3 minutes. Elles sont ensuite repiquées à un nombre de $3 \cdot 10^6$ cellules pour les expériences, dans une boîte Falcon T75 (Cell Star®) ou dans une boîte de pétris.

3.2. Homogénats de MEFs

L'homogénat est réalisé avec 6 boîtes de pétris contenant des MEFs de chaque type cellulaire à une confluence de 80%.

Les boîtes de pétris sont d'abord rincées 3 fois avec du saccharose 0,25 M conservé dans la glace. Puis, elles sont grattées une première fois dans 2ml de saccharose et une seconde fois dans 5 ml de saccharose. La suspension est ensuite portée à 50 ml et centrifugée à 1000 rpm (ou 8000 xg) pendant 10 minutes. Le culôt est resuspendu dans quelques centaines de µl de saccharose 0,25M. On effectue ensuite 20 passages au dounce loose.

La suspension est portée à un volume final de 2ml. Les cellules lysées seront ensuite aliquotées par 500µl et congelées à -20° jusqu'à une utilisation ultérieure.

3.3. Extraction d'ARN

3.3.1. Principe

Après homogénéisation à l'aide d'une colonne "Quiashredder", l'ARN est extrait des cellules grâce au kit "Rneasy". Il est ensuite quantifié et analysé par RT-PCR. Cette méthode nécessite de travailler dans des conditions Rnase Free afin de ne pas dégrader l'ARN.

3.3.2. Méthode

- Récolte des cellules: les cellules sont grattées dans 600 µl de Buffer RLT et récupérées dans un eppendorff.
- Homogénéisation: le lysat cellulaire est déposé sur une colonne Quiashredder qui est centrifugée pendant 2 minutes à 13000 rpm avec une centrifugeuse de table de type eppendorff..
- Fixation de l'ARN : un volume d'éthanol 70 % est ajouté au lysat récupéré et mixé par pipetting. 700µl d'échantillon sont déposés sur une colonne Rneasy placée sur un tube de 2ml. Après 15 secondes de centrifugation à 10000 rpm, le flowthrough est jeté. Un premier lavage est effectué en ajoutant 700 µl de Buffer RW1 (composé de guanidine thiocyanate) sur la colonne et en centrifugeant 15 secondes à 10 000 rpm. Un second lavage est effectué en ajoutant 500µl de Buffer RPE sur la colonne qu'on fait également centrifuger 15 secondes à 10 000 rpm. Cette étape est renouvelée et également centrifugée 2 minutes à 10 000 rpm. Un nouveau tube de 2ml est placé sous la colonne puis on re-centrifuge 1 minute à 13000 rpm afin d'éliminer toute trace de buffer RPE.
- Elution : un tube de 1,5 ml est placé sous la colonne afin de récupérer l'ARN. L'élution est réalisée en ajoutant 30 µl d'eau Rnase Free sur la membrane de la colonne puis en centrifugeant 1 minute à 10000 rpm. L'ARN ainsi récupéré peut soit être stocké à - 20°C ou directement dosé.
- L'ARN est dosé avec un spectrophotomètre UV en convertissant l'absorbance lue à 260 nm en concentration d'ARN (µg/µl) à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Absorbance} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{facteur de dilution}$$

3.4. Synthèse d'ADNc à partir d'ARN et PCR (RT-PCR)

3.4.1. Réverse transcription

3.4.1.1. Principe

La rétro-transcription de l'ARNm en ADNc est indispensable à l'étape ultérieure d'amplification par PCR. Dans un premier temps, l'ARN est chauffé afin de le dénaturer. Ensuite, les éléments pour la synthèse de l'ADNc sont ajoutés.

3.4.1.2. Méthode

2 µg d'ARN sont prélevés et de l'H₂O Rnase Free est ajoutée pour obtenir un volume total de 6µl par échantillon. Les échantillons sont chauffés pendant 10 minutes à 70°C (Thermocycler Perkin Elmer) afin de dérouler l'ARN.

Le Mix est préparé pour la reverse-transcription (Figure 3.1.). 14µl de ce mix sont ajoutés aux 6µl d'échantillon. Les échantillons sont ensuite centrifugés 1 minute à 13000 rpm, puis, laissés 5 minutes à température ambiante.

Les échantillons sont traités 1 heure à 42°C puis 5 minutes 95°C dans le thermocycler Perkin Elmer. L'échantillon est porté à 100 µl avec de l'eau Rnase Free et l'ADNc est conservés à -20°C.

3.4.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.4.2.1. Principe

La PCR permet d'amplifier de manière exponentielle un segment particulier d'ADN cible. Le matériel de départ de la PCR est composé d'une solution d'ADN bicaténaire contenant la séquence nucléotidique "visée" par le recopiage. On ajoute une enzyme, l'ADN polymérase, les quatre bases nucléotidiques en quantité suffisante (pour former le nouvel ADN) et des amorces c'est à dire des séquences nucléotidiques de la région à amplifier

La réaction commence par la séparation des brins d'ADN cible qui se fait à une température de 94°C. On refroidit ensuite l'ADN à une température variable définie en fonction des amorces utilisées, pour permettre aux amorces de former des liaisons hydrogène avec les extrémités de la séquence cible. L'élongation des amorces par l'ADN polymérase va se faire à une température d'activité propre à l'enzyme. La solution est enfin réchauffée à 94°C pour séparer les ADN bicaténaires et un nouveau cycle est ainsi entamé. Une succession de 30 à 35 cycles permet de visualiser au bromure d'éthidium le fragment d'ADN amplifié.

3.4.2.2. Méthode

Un mix pour la PCR est réalisé (Figure 3.2.). Deux couples d'amorces ont été utilisées pour amplifier la séquence Hyal 1 de souris: s2 hyal 1m et as 6 hyal 1m, LJ-mhyal s et LJ-mhyal1s. Un couple d'amorce spécifique de la GAPDH a été utilisé afin de vérifier la qualité de l'ADNc synthétisé : sens LJ-mGAPDH et antisens LJ-mGAPDH (Figure 3.3.)

2 µl d'ADNc et 18 µl du mix sont utilisés pour réaliser la PCR dans un volume final de 20 µl.

L'amplification est réalisée par la succession des cycles de différentes températures dans le thermocycler "Perkin Elmer" avec la programmation suivante:

Pour 35 cycles					
Température	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
Temps	5min	30sec	30sec	1min	7min

3.5. Electrophorèse sur gel d'agarose

3.5.1. Principe

L'électrophorèse sur gel consiste à séparer les macromolécules en fonction de leur vitesse de déplacement à travers un gel sous l'effet d'un champ électrique. Ce champ est produit par des électrodes placées à chaque extrémité du gel. Les mélanges d'acides nucléiques sont placés dans des puits. Chacune des macromolécules chargées négativement vont ainsi migrer alors vers l'électrode de signe opposé (positive) à une vitesse qui dépend surtout de sa charge et de sa taille.

Afin de visualiser les macromolécules sur le gel, on ajoute du bromure d'éthidium. C'est un agent intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence "rose" à la suite d'une exposition aux UV.

3.5.2. Méthode

Pour un gel d'agarose de 1%, 1g d'agarose est solubilisé dans 100ml de tampon TAE (composé de Tris 40 mM pH 7.2, d'acétate de sodium 20 mM et de EDTA 1 mM) et chauffés au four à micro-onde jusqu'à ébullition.

5 µl de bromure d'éthidium (1mg/ml) sont ajoutés et le gel est coulé dans un moule en plexiglas. Des peignes permettant de creuser des puits pour le dépôt des échantillons, sont insérés dans le gel. Le gel polymérisé est ensuite placé dans une cuve remplie de tampon TAE. Les échantillons sont alors déposés dans les puits. Un marqueur de taille (Smart Ladder) est déposé en parallèle afin de définir la taille de fragment d'ADN. La migration est réalisée à 90V pendant environ 1h. A l'aide d'un trans-illuminateur UV à 302nm, les bandes d'amplification d'ADN sont visualisées.

3.6. Microscopie électronique à transmission

3.6.1. Principe

Le microscope électronique à transmission a été utilisé afin d'examiner les structures subcellulaires des cellules. Elle permet d'observer les échantillons par transparence en utilisant des électrons comme rayonnement. Pour pouvoir être examiné, l'échantillon doit être stable sous vide et suffisamment mince pour transmettre les électrons. L'échantillon doit d'abord être fixé au moyen de fixateurs chimiques. Le fixateur le plus souvent utilisé est le glutaraldéhyde. C'est une molécule qui grâce à ses deux aldéhydes, peut former de multiples liens covalents entre chaque protéine.

Ensuite, ils sont déshydratés progressivement dans de l'éthanol, puis enfin imbibés par une résine époxy qui polymérisera avec la chaleur. Lorsque l'échantillon est suffisamment solidifié, de fines tranches de 5 nm d'épaisseur sont découpées à l'aide d'un ultramicrotome. La dernière étape est de contraster l'échantillon avec des atomes de métaux lourds comme l'acide osmique. L'acide osmique va se lier aux phospholipides des membranes et stabiliser ces structures, ainsi que les protéines.

Dans le cadre de ce mémoire, une coloration des phosphatases acides, la coloration de Gomori, va permettre de mettre en évidence les lysosomes contenus dans le cytoplasme cellulaire. En effet, la réaction de deux réactifs, le Chlorure de cérium et le β -glycérophosphate de sodium, va provoquer des précipités qui se logeront dans la cavité lysosomale.

3.6.2. Méthode

Les cellules sontensemencées en nombre de 250000 dans des plaques 6 puits et incubées dans leur milieu de culture pendant 3 jours. Quand elles ont atteint un stade de confluence de 80%, des lavages sont effectués avec du milieu de culture sans sérum.

Une première fixation est réalisée avec de la glutaraldéhyde 2,5% associée à du tampon cacodylate 0,1 M pH7,4 pendant 1h. La glutaraldéhyde est un fixateur couramment utilisé pour la fixation des cellules tandis que le cacodylate est un tampon qui est principalement utilisé pour sa capacité à maintenir la structure des membranes cellulaires.

Les cellules sont ensuite incubées dans une solution composée de CeCl_3 3mM, de β -glycérophosphate de sodium 7mM et de tampon acétate 100mM pH 5 pendant 2h à 37°C. Après avoir effectué plusieurs lavages avec le tampon cacodylate 0,1M pH 7,4, les échantillons sont re-fixés toujours dans de la glutaraldéhyde 2,5% /tampon cacodylate 0,1 M pH7,4 pendant 1h. Plusieurs fois sont rincés avec du cacodylate 0,1M pH 7,4.

Les cellules sont enfin post-fixées dans du OsO_4 0.1M, cacodylate 0.1M pH7.4. Cette étape sera également suivie de rinçages dans du tampon cacodylate 0.1M pH7.4

Une fois la post-fixation terminée, les échantillons sont déshydratés successivement dans différents pourcentages d'alcool (Figure 3.4.) puis imbibés 2X15 minutes dans un mélange d'alcool et de résine LX112 et ensuite, 30 minutes dans de la résine complète.

Pour terminer, les cellules sont placées dans l'étuve à différentes température.

37°	1 nuit
45°	24H
60°	48H

Les échantillons seront découpés avec un ultramicrotome à une épaisseur de 5 nm et contrastés avec de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb.

3.7. Immunofluorescence

3.7.1. Principe

L'immunofluorescence permet de détecter et de localiser de manière spécifique un composant cellulaire grâce à une reconnaissance anticorps-antigène et à une émission de fluorescence. La fixation d'un anticorps primaire sur l'antigène est mise en évidence par un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc de cet anticorps primaire et couplé à un fluorochrome qui émet de la fluorescence suite à son excitation à une longueur d'onde précise.

3.7.2. Méthode

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles stériles dans des plaques de 24 puits et incubées dans leur milieu habituel DMEM décrit précédemment pendant 2 jours (confluence à 80 %).

Quand les cellules sont prêtes, elles sont rincées au PBS 1X puis fixées et perméabilisées dans une solution composée de 80% de méthanol et 20% d'acétone froid pendant 8 minutes. Une autre fixation a été utilisée dans ce mémoire : la paraformaldéhyde 4%. Cette solution ne possède pas comme le méthanol/acétone, la capacité de fixer et de perméabiliser en même temps. De ce fait, les cellules doivent subir une première étape de fixation avec le paraformaldéhyde pendant 10 minutes, puis après des rinçages au PBS, les cellules sont perméabilisées par du PBS-triton 1%.

Dans les deux cas de fixation, les lamelles sont ensuite rincées 3X au PBS 1X puis bloquées dans une solution composée de PBS-BSA 3% pendant 30 minute afin d'éviter la fixation non spécifique de l'anticorps primaire.

Les cellules sont incubées en présence de l'anticorps primaire. Dans le cadre de ce mémoire, l'anticorps primaire anti-Lamp1 a été utilisé à une dilution de 1/250 dans du PBS-BSA 3%. L'utilisation du polyclonal de Frost anti-Hyal 1, le monoclonal 17E9 anti-Hyal 1 et du 1D10 ont été requises. Le polyclonal, le monoclonal et 1D10 ont été dilués 1/100 aussi dans du PBS-BAS 3%. La lamelle est retournée sur une goutte de 30 µl d'anticorps primaire pendant 2h dans un environnement humide sous une feuille d'aluminium. Après ces 2h, les lamelles sont rincées 3X dans du PBS-BSA 3%.

Les cellules sont ensuite incubées en présence d'anticorps secondaire: l'anticorps secondaire spécifique des immunoglobulines choisis pour la reconnaissance primaire et couplés à une fluorochrome, est dilué à 1/500 dans du PBS-BSA 3%.

L'anticorps anti-Lamp 1 est reconnu par l'anticorps secondaire anti-Rat "Rouge" dilué à 1/500 dans du PBS-BSA 3%.

Les anticorps anti-Hyal 1 (le polyclonal de Frost, le monoclonal 17E9 et le 1D10) sont reconnus par l'anticorps secondaire anti-souris « vertes » utilisé à une dilution de 1/500 dans du PBS-BSA 3%. Comme précédemment, une goutte de 30µl d'anticorps secondaire est incubée avec les cellules en chambre humide à l'obscurité pendant 1heure.

Les contrôles négatifs sont réalisés en incubant uniquement les cellules avec de l'anticorps secondaire. Les cellules sont rincées 3x au PBS 1X.

Pour marquer les noyaux des cellules, on utilise du TO-PRO 3. Il a la particularité de s'insérer entre les chaînes d'acides aminés. Le TO-PRO se prépare à partir d'une solution stock qui est diluée 1/80 avec dans une solution de Rnase 2mg/ml.

Les cellules sont incubées pendant 35 minutes dans une chambre humide. Une série successive de rinçages avec du PBS 1X est réalisé. Les lamelles sont enfin montées au mowiol sur lame et laissées en chambre froide toute une nuit.

La visualisation se fait au microscope confocal. Les images sont réalisées à l'aide du microscope LEICA TCS SPI. Il est équipé d'un laser Argon-Krypton. L'objectif est un HCX PLANAPO 63X.

3.8. Western Blot

3.8.1. Principe

Le Western Blot est une méthode qui permet de détecter la présence d'une protéine dans un échantillon cellulaire. En pratique, il s'agit de séparer les protéines de l'échantillon en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS. Ensuite, les protéines seront transférées sur une membrane PVDF par l'application d'un champ électrique puis incubées avec un anticorps primaire reconnaissant la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire couplé à une peroxydase de Raifort (HRP) est utilisé pour lier l'anticorps primaire. La protéine pourra être localisée sur la membrane par ajout de H₂O₂ et de luminol (Kit Western Lightning Chemiluminescence 103 ou Kit Amersham), le mélange des deux réactifs permettant l'émission de photons qui impressionnent le film exposé à la membrane.

3.8.2. Méthode

- Préparation des gels d'acrylamide (Figure 3.5.)

Le Western Blot est composé de deux gels d'acrylamide de composition différente placés l'un au-dessus de l'autre. Le gel supérieur est appelé gel d'empilement tandis que le gel inférieur est un gel de séparation. Ces gels contenant habituellement 8%, 10% ou 12% d'acrylamides sont coulés dans des systèmes Biorad.

- Préparation des échantillons:

En général, X µg de protéines allant de 10 à 50 µg sont prélevés pour chaque échantillon à faire migrer. Ces échantillons sont traités en ajoutant de la solution alourdissante et réduit par l'ajout de β mercaptoéthanol (5µl de β-mercaptoéthanol pour 100 µl de solution alourdissante). La dénaturation est achevée par une incubation de 3 minutes à 100°C.

- Préparation à la migration:

Le gel est baigné dans du tampon de migration 1X (Tris 25 mM, glycine 192mM, SDS 0.1% pH 8.6) et les échantillons sont chargés dans le puits. Un marqueur de poids moléculaire "ProSieve"(ProSieve®Color Protein Marker) est déposé en parallèle des échantillons. Une tension de 80 volts est appliquée pendant 10 minutes afin que les protéines aient le temps de se tasser dans le gel d'empilement. Ensuite, le voltage est augmenté à 100 volts pendant une heure afin que se fasse la séparation des protéines suivant leur poids moléculaire. En effet, les protéines chargées négativement par le SDS contenu dans la solution alourdissante (composée de SDS 0.1%, Bleu de bromophénol 0.06%, glycérol 14%, Tris-Hcl 300mM pH6.8), migrent à travers le gel vers la borne négative. La vitesse de migration est inversement proportionnelle à la taille de la protéine.

- Transfert sur membrane Polyscreen® PVDF (PolyVinylidene DiFluoride).

La membrane est d'abord traitée au méthanol 100% pendant 1 min et ensuite, plongée dans le tampon de transfert composé de 25mM HCl-tris, de 192mM glycine et de méthanol 20%.

Dans une cuve de transfert semi-sec "Hoefer Semiphor", on réalise un montage en sandwich composé d'éponges, de papier Whatman 3MM (10cm x 6,5 cm) imbibés de tampon de transfert et la membrane PVDF traitée. Sur cette membrane, le gel est déposé et recouvert à nouveau de papier Wattman puis d'éponges.

On applique un courant de 8 Volts limité à 250mA qui permet aux protéines chargées négativement de transférer vers la membrane placée du côté de la borne positive de la cuve.

- Coloration en rouge Ponceau:

Le rouge ponceau est un colorant réversible qui permet de révéler l'ensemble des protéines présentes sur la membrane après le transfert.

Les membranes sont traitées pendant 10 minutes dans environ 20 ml de solution rouge Ponceau (Rouge Ponceau S 0,1% dans 5% d'acide acétique). Elles sont ensuite rincées à l'eau et scannées.

- Blocking

Afin d'éviter un accrochage aspécifique de l'anticorps primaire, les membranes sont "bloquées", c'est à dire saturées en protéines dans du lait 5% (2g de lait dans 40 ml de PBS-tween 0,1%) pendant une nuit à 4°C. On effectue ensuite quelques rinçages dans du PBS-tween 0,1%.

- Incubation de l'anticorps primaire:

Chaque membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans une solution composée de 10 ml de PBS-tween 0,1%-BSA 1%, pendant 1 heure à température ambiante. L'anticorps anti-Hyal 1 1D10 a été utilisée à une dilution de 1/2000 de même que le polyclonal anti-Hyal 1 de lapin (Frost) et anti-Lamp 1 1D4B a une dilution de 1/500. On rince ensuite dans PBS-tween 0,1%.

- Incubation de l'anticorps secondaire:

Les membranes sont ensuite incubées 45 minutes à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire couplé à une HRP (Horse Raddish Peroxydase) qui lui est dans 10ml de PBS-BSA 1%. L'anticorps 1D10 est reconnu par une Ig G anti-souris HRP à une dilution de 1/8000 tandis que le polyclonal de Frost est reconnu par un anticorps anti-lapin HRP (1/8000). On rince ensuite quelques fois dans du PBS-tween 0,1%.

- Révélation avec un kit de chemiluminescence.

La révélation s'effectue par l'exposition d'un film Kodak sur les membranes traitées avec une solution de révélation. Cette solution est le mélange de luminol et d'une réaction oxydante.

3.9. Zymographie

3.9.1. Principe

La zymographie est une méthode permettant de mettre en évidence l'activité hyaluronidasique couplant ainsi une électrophorèse de protéines et une incubation enzyme-substrat. En effet, un gel d'acrylamide contenant de l'HA est réalisé. Les échantillons testés pour la présence ou non d'activité hyaluronidasique sont déposés dans des puits au sommet du gel et un courant électrique est appliqué pour la migration et la séparation des protéines.

3.9.2. Méthode

- Préparation des gels (Figure 3.6.)
- Préparation des échantillons:

Les protéines sont préalablement dosées dans chaque échantillon suivant la méthode de Bradford. Une solution alourdisant 5x concentrée est ajoutée pour obtenir une dilution finale. Contrairement au Western Blot, les échantillons ne sont ni réduits ni dénaturés afin de préserver l'activité.

- Migration des échantillons:

La migration des échantillons est réalisée dans le tampon de migration décrit précédemment pour le western Blot. Cependant, ils sont refroidis pour préserver l'activité de la protéine. Pour cela, la cuve est placée dans de la glace. La migration se fait sous agitation. Elle commence par 10 minutes à 80 volts puis se poursuit en augmentant à 90 volts (ou plus) pendant 2h-2h30. Un ampérage de 0,01 est conservé tout au long de la migration.

- Après la migration:

Le gel de séparation uniquement est gardé et traité dans du triton X-100 3% 2h à température ambiante sous agitation. Le triton est remplacé par une solution de formate (composée de solution formate 0.1M, NaCl 0.1M à pH 3.7). Cette solution formate est renouvelée après 30 minutes toujours sous agitation à température ambiante et ensuite, incubée overnight à 39°C sur agitateur afin de permettre la digestion du HA par son enzyme.

Le gel est rincé abondamment et traité dans une solution de pronase 0,1mg/ml dans du tris 20mM pH 8. On laisse agiter 2h à 39°C. Différentes étapes de rinçages sont ensuite réalisées. Afin de préparer le gel à la coloration, on ajoute 40ml de formamide 50%. La coloration est composée de Stains-all 0,005%, de formamide et d'eau (tableau). Le Stains-all a la particularité de colorer alors en bleu le HA contenu dans le gel et laisse "rose" les parties digérées témoignent de l'activité hyaluronidasique à cet endroit.

Le gel est maintenu à l'abri de la lumière pendant que se réalise la coloration. Le temps de coloration du gel peut varier. Pour le gel présenté dans ce mémoire, il a fallu au moins 2 semaines de coloration.

3.10. Lysotracker et NAO

3.10.1. Le lysotracker

3.10.1.1. Principe

Les sondes du Lysotracker sont des sondes fluorescentes qui marquent et pistent les organites acides dans les cellules vivantes. Elles sont composées d'un fluorochrome lié à une base faible partiellement protonée à pH neutre. Les sondes sont librement filtrées à travers la membrane cellulaire et d'une manière typique, concentrées dans les organites sphériques. Le mécanisme de rétention de la sonde à l'intérieur de l'organite n'est pas clairement établi mais serait lié à une protonation de la sonde. La fluorescence émise est alors analysée par microscopie confocale.

3.10.1.2. Méthode

La solution stock (1mM) contenant la sonde lysotracker®Red (Invitrogen Molecular Probes) est d'abord diluée dans du milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 500nM. 500µl de cette dilution sont déposés sur des lamelles stériles préalablement ensemencées au nombre de 3 milles cellules dans des plaques 24 puits. L'incubation des sondes sur les cellules se fait à 37°C pendant 15 minutes. Des lavages successifs sont réalisés d'abord avec du milieu de culture, ensuite avec du PBS 1X. Les lamelles sont montées sur lame avec du mowiol. Les cellules ainsi sans fixation doivent être visualisées au confocal dans l'heure qui suit (λ_{exc} max 577 nm ; λ_{em} 590 nm).

3.10.2. NAO

3.10.2.1. Principe

Le NAO, 10-Nonyl acridine Orange, est un marqueur des membranes internes des mitochondries dans les cellules entières, indépendamment de leur stade énergétique. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas clairement déterminé, le NAO se lie aux phospholipides chargés négativement (cardiolipine, phosphatidylinositol et phosphatidylsérine). Selon une hypothèse, la sélectivité du NAO pourrait résulter de l'insertion des groupes nonyl dans la bicouche de la surface hydrophobique générée par la présence des quatre chaînes se trouvant dans la molécules de cardiolipines. C'est une méthode efficace pour la quantification des cardiolipines dans les membranes, de même que la quantification des organites contenant les cardiolipines, c'est à dire les mitochondries.

3.10.2.2. Méthode

3.10.2.2.1. Les solutions utilisées

- Tampon HBSS de stock composé de: 137mM NaCl, 5,36 mM KCl, 337µM Na₂ HPO₄, 441µM KH₂PO₄, 406µM MgSO₄(7H₂O), 492 µM MgCl₂(6H₂O), 4,17mM NaHCO₃ et glucose 5mM.
- CaCl₂ 100mM
- NAO (A1372, Molecular Probes): solution stock de NAO à 10mM dans du DMSO ou de l'éthanol.

La solution de travail est préparée fraîchement à partir de la solution HBSS de stock et de CaCl₂ préchauffés à 37°C. On ajoute le CaCl₂ dans l'HBSS pour obtenir une concentration finale de 1mM. Le pH de la solution est ajustée à 7,35

Dans cette solution est dilué le NAO de stock pour obtenir une concentration finale de 1µM.

3.10.2.2.2. Protocol

Les cellules préalablement ensemencées en nombre de 300 milles cellules sur des lamelles stériles dans des 24 puits, sont d'abord rincées 2X avec 1 ml de HBSS et de CaCl₂ (ajout de CaCl₂ juste avant l'expérience). Certaines lamelles sont incubée avec 1 ml de la solution de NAO dilué tandis que d'autres qui serviront de blanc sont incubés avec 1ml de HBSS préparé avec du CaCl₂.

Cette incubation est réalisée pendant 10 minutes dans l'obscurité. Des lavages seront ensuite effectués avec de l'HBSS préparé. Les lamelles sont montées au mowiol et visualisées au microscope confocal ($\lambda_{\text{exc}} \text{ max } 498 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} \text{ max } 519 \text{ nm}$).

3.11. Mesure de la respiration cellulaire par l'oxypolarographie (Hofhaus et al., 1993)

3.11.1. Principe

L'oxypolarographie permet la mesure spécifique de la concentration en oxygène des solutions. Cet appareil comprend deux parties: l'électrode de Clark qui produit un courant électrique, et un millivoltmètre enregistreur qui va mesurer ce courant. Dans une certaine limite, le courant électrique qui traverse le système est proportionnel à la concentration en oxygène de la solution.

Dans le cadre de ce mémoire, la mise en évidence de la respiration et de la phosphorylation oxydative vont se faire par la mesure de la consommation d'O₂ par les mitochondries en présence de certains substrats comme du succinate. L'étude de la respiration des cellules sans perméabilisation par la digitonine va également être mesurée.

3.11.2. Méthode

- Préparation de l'oxypolarographie (Gilson)

Afin de régler la mesure de la consommation en oxygène, de l'eau saturée en O₂ et à une température de 37°C est déposée dans la chambre et agitée avec un barreau magnétique. La chambre est rincée plusieurs fois avec cette eau. L'aiguille de l'enregistreur est alors placée sur 100 ce qui correspond à la valeur de saturation en O₂ (100%). Après stabilisation, 0,5 ml d'une solution de levures est ajoutée dans la chambre. La respiration de celle-ci permettra une consommation totale de l'O₂ et le réglage de l'aiguille sur 0. Ensuite, plusieurs rinçages à l'eau sont effectués. Enfin, de l'eau saturée est à nouveau déposée dans la chambre pour amener l'aiguille à 100.

- Préparation des solutions

Milieu A: 20mM de HEPES pH 7,1 (4,76g/L), 250mM de sucrose (8,55g/L), 10mM MgCl₂

10% de digitonine dans du DMSO à diluer 1000 fois

Du succinate M : 2,7 g/10 ml pH 7,1

Milieu de respiration: Milieu A + 1mM ADP+ 2 mM KH₂PO₄

- Traitement des cellules

5 millions de cellules sont nécessaires pour le test. Le milieu de culture de ces cellules est changé la veille de la mesure.

Pour l'expérience, les cellules sont rincées à l'HBSS puis trypsinisées et récupérées dans du milieu DMEM. Après une centrifugation de 3 minutes à 350g (ou 1000 rpm), le culôt est resuspendu dans 1ml de milieu A auquel on ajoutera par la suite 1ml de milieu A et de la digitonine à 100µg/ml pendant 1 minute. La digitonine permet la perméabilisation des cellules. Cette réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 8ml de milieu A. Les cellules sont à nouveau centrifugées 3 minutes à 350 g. Le culôt est resuspendu dans 10ml de milieu A qui sera une nouvelle fois re-centrifugé 3 minutes à 350 g

Pendant ce temps, la chambre de respiration est préparée en ajoutant 1,45 ml de milieu de respiration préchauffé à 37°C. L'aiguille est amenée à 100.

Le culôt obtenu après centrifugation, est resuspendu dans 100µl de milieu de respiration et immédiatement, ajouté dans la chambre. On ferme celle-ci immédiatement pour éviter toute modification d'O₂ due au milieu extérieur. Le millivoltmètre se met en marche mesurant ainsi l'activité oxydative.

- Calcul de la mesure de la respiration :

La consommation en O₂ des cellules est reporté graphiquement sur un oxypolarogramme. Comme précisé précédemment, l'aiguille est positionnée à 100% d'oxygène quand l'expérience débute. Lorsque les cellules sont ajoutés dans la chambre, l'aiguille va diminuer suivant l'oxygène consommé par les cellules. Après 2 minutes de roulement du millivoltmètre, 10 µl de succinate sont ajoutés. Le succinate est un pourvoyeur de FADH₂ qui fournit des électrons à la chaîne de transfert. Lorsque ce substrat est ajouté en présence d'ADP, la respiration mitochondriale est augmentée provoquant ainsi l'augmentation de la consommation de l'oxygène jusqu'à la phosphorylation complète de l'ADP.

Pour pouvoir mettre en relation la dépendance de la vitesse de la respiration en fonction de la disponibilité de l'ADP, on calcule le contrôle respiration en effectuant le rapport entre l'intensité respiratoire (exprimée en mole de O₂ consommé par unité de temps et mg de protéines) en présence d'ADP et l'intensité respiratoire en absence d'ADP. L'intensité respiratoire est calculée en faisant le rapport entre le facteur de solubilité de l'oxygène multipliant par la pente de la consommation de l'O₂ (en pourcent) et le temps de roulement du papier (en minute) multiplié par la quantité de protéine.

Facteur de solubilité de l'oxygène : 279 nmoles O₂/ml = 100%

$$IR = \frac{279 \text{ (nmole/ml)} \times \% \text{ de la lecture de la pente de la consommation d'oxygène}}{100 \times \text{Temps (minute)} \times \text{protéine (mg)}}$$

$$CR = \frac{IR \text{ en présence d'ADP}}{IR \text{ en absence d'ADP}}$$

3.12. Fractionnement complet par centrifugation différentielle.

Un homogénat de cultures de cellules MEF +/+ et de cellules MEF -/- est réalisés, il contient tous les organites de ces cellules en suspension. Il est ensuite fractionné suivant le schéma de DE DUVE et al. (1955). Cette méthode fait appel à la centrifugation qui permet la séparation des particules en fonction de leur taille et de leur vitesse de sédimentation. Cinq fractions hétérogènes sont obtenues (Figure 3.7.):

La fraction N est constitué essentiellement de noyaux, de vésicules de membrane plasmique, de débris cellulaires et de quelques cellules intactes ayant résisté à l'homogénéisation.

La fraction M, ou Mitochondriale lourde, renferme, quant à elle, des mitochondries mais aussi des lysosomes et des peroxysomes en quantité appréciable.

La fraction L ou Mitochondriale légère est enrichie en lysosomes et en peroxysomes.

La fraction P microsomale contient pour sa part, des éléments du réticulum endoplasmique et du golgi, ainsi que des fragments de la membrane plasmique.

La fraction S, ou fraction soluble est constituée de tous les éléments non sédimentables de la cellule dans ces conditions.

La teneur relative en divers granules des fractions isolées par centrifugation est estimée en mesurant l'activité d'enzymes associées spécifiquement à un type donné de granule (voir "enzymes de référence").

3.13. Centrifugation isopycnique en gradient continu de saccharose de la fraction MLP.

En centrifugation isopycnique, les particules sont centrifugées dans un gradient de densité jusqu'à ce qu'elles occupent la position correspondant à leur densité d'équilibre; à ce moment leur vitesse de sédimentation devient nulle. Dans ce cas, la séparation des granules se fait selon un critère de densité.

Une fraction MLP est déposée au sommet d'un gradient linéaire de saccharose dont les limites de densité sont 1,09 et 1,26 g/ml. Il est soumis à une centrifugation en rotor à godets basculants SW55Ti pendant 2h30 à 92435 xg. Après centrifugation, le gradient est découpé en 13 fractions afin de récupérer les différentes fractions de densités croissantes. Pour chaque fraction, la mesure de la hauteur de la coupe et de poids est effectuée permettant d'obtenir une estimation du volume de chaque fraction. Le dosage des enzymes marqueurs est réalisé sur ces différentes fractions.

3.14. Centrifugation isopycnique en gradient de Percoll

Une fraction ML est déposée au sommet d'un gradient linéaire de Percoll avec une densité s'étalant de 1.043g/ml à 1.12 g/ml, préformé dans du saccharose 0.25M et du tampon imidazol 3mM pH 7.4. Le gradient est ensuite centrifugé 1h à 59255xg dans un rotor SW55Ti de type Beckman. Après centrifugation, le gradient est découpé en 13 fractions. Pour chaque fraction, la mesure de la hauteur de la coupe et de poids est effectué permettant d'obtenir une estimation du volume de chaque fraction. Le dosage des enzymes marqueurs est réalisé sur ces différentes fractions.

3.15. Centrifugation isopycnique en gradient de Nycodenz

Une fraction MLP est déposée au sommet d'un gradient linéaire de Nycodenz dont la densité s'étend de 1.05 g/ml à 1.193 g/ml. Les solutions de Nycodenz sont ajustées à pH 7.4 à l'aide de NaOH 0.01N. Le gradient est ensuite centrifugé 2h30 à 92435xg dans un rotor SW55Ti de type Beckman. Après centrifugation, le gradient est découpé en 13 fractions. Pour chaque fraction, la mesure de la hauteur de la coupe et de poids est effectué permettant d'obtenir une estimation du volume de chaque fraction. Le dosage des enzymes marqueurs est réalisé sur ces différentes fractions.

3.16. Les enzymes de référence

Les enzymes testées dans ce travail pour caractériser les organites sont, pour:

- Les mitochondries: la cytochrome oxydase.
- Les lysosomes: la bêta-galactosidase, la glucosidase acide, la bêta-hexosaminidase, la bêta-glucuronidase, l'hexosaminidase, la glucuronidase et de la phosphatase acide.
- Les protéines sont dosées par la méthode Folin ou la méthode Biorad Protein reagent Assay (Bradford).

Les conditions expérimentales pour la mesure des enzymes sont décrites à la figure 3.8.

Chaque substrat de l'enzyme à doser, est lié à du méthylumbelliféron. Le méthylumbelliféron est une molécule fluorescente. Le substrat de l'échantillon sera clivé par l'enzyme contenu dans celui-ci et libérera alors le méthylumbelliféron dont la fluorescence sera mesurée au fluorimètre

4. Résultats et discussion

Les résultats présentés dans ce mémoire reposent sur la comparaison entre des MEFs déficientes en HYAL 1 (MEFs -/-) et des MEFs contrôles ou « wild type » (MEFs +/+ ; WT). Il est à noter que les deux types de MEFs proviennent de souris de souches différentes. En effet, les MEFs déficiente en HYAL 1 proviennent de la lignée C57/B tandis que les MEFs WT proviennent de la lignée C549. Les caractéristiques morphologiques observées chez les MEFs + /+ sont des caractéristiques habituellement retrouvées chez ce type cellulaire, à la fois pour les souris C57/B et C549.

4.1. Résultats préliminaires

Une première observation au microscope optique a été effectuée (**Figures 4.1 et 4.2**). Les MEFs +/+ se présentent comme des cellules de forme étoilée et plutôt allongée, couvertes de fins prolongements filiformes. Lorsqu'elles ont atteint un stade de confluence avancé, ces cellules sont fusiformes. Cette description rejoint les caractéristiques générales observées chez les fibroblastes. En revanche, les MEFs -/- ont une forme plus arrondie avec moins de prolongements. Leur noyau semble également plus volumineux. On peut apercevoir des granules qui caractérisent leur phénotype.

Une analyse plus approfondie en microscopie électronique à transmission (MET) a permis de mettre en évidence de grosses vésicules denses occupant une partie non négligeable du cytoplasme des MEFs KO. Ce phénotype n'est pas retrouvé chez les MEFs WT (**Figures 4.3. et 4.4**). Les nombreuses vacuoles observées dans les MEFs déficientes en HYAL 1 pourraient être associées aux lysosomes (Communication personnelle du Département d'Histologie). Cette observation rejoindrait l'hypothèse selon laquelle l'enzyme Hyal 1 est lysosomale. L'observation en MET montre également une morphologie peu habituelle des mitochondries. En effet, elles semblent légèrement déformées. Une étude plus approfondie des lysosomes et des mitochondries sera donc réalisée dans le cadre de ce mémoire.

4.2. Caractérisation de l'outil

Nous souhaitons d'abord vérifier que les MEFs provenant des souris KO en HYAL 1 ne possèdent ni l'ARNm ni la protéine s'y rapportant. Pour réaliser cette étude, plusieurs techniques ont été utilisées : la RT-PCR, l'immunofluorescence, le Western blot et la zymographie. Les informations qu'apportera chacune de ces méthodes seront complémentaires.

4.2.1. Détection du messenger de HYAL 1

La RT-PCR a été effectuée à partir de cellulesensemencées à raison de 3 millions dans des boîtes T75.

4.2.1.1. Conditions techniques

Dans le cadre de ce mémoire, deux couples d'amorces ont été utilisés : d'une part, s2hyallm et as6 hyallm, et d'autre part LJ-mhyall1s et LJ-mhyall1as, donnant respectivement des fragments d'une taille de 700 pb et de 431 pb. Des amorces pour l'amplification de la GAPDH de la souris ont également été utilisées afin de s'assurer de la qualité du cDNA et de normaliser les résultats. Le fragment résultant de cette amplification est de 289 pb.

4.2.1.2. Résultats et interprétation

La RT-PCR (**Figure 4.5**) montre l'amplification du fragment de HYAL 1 aux tailles espérées pour les différents couples d'amorces, et ce uniquement dans les MEFs +/+. Ce résultat confirme donc que les MEFs -/- n'expriment pas le transcrit HYAL 1. Le fait que la GAPDH soit amplifiée dans les deux types cellulaires prouve que la non-expression de HYAL1 dans les MEFs -/- n'est pas due à une mauvaise qualité de l'ADNc mais bien à une absence du messager. Il est à noter que les contrôles négatifs sont valides.

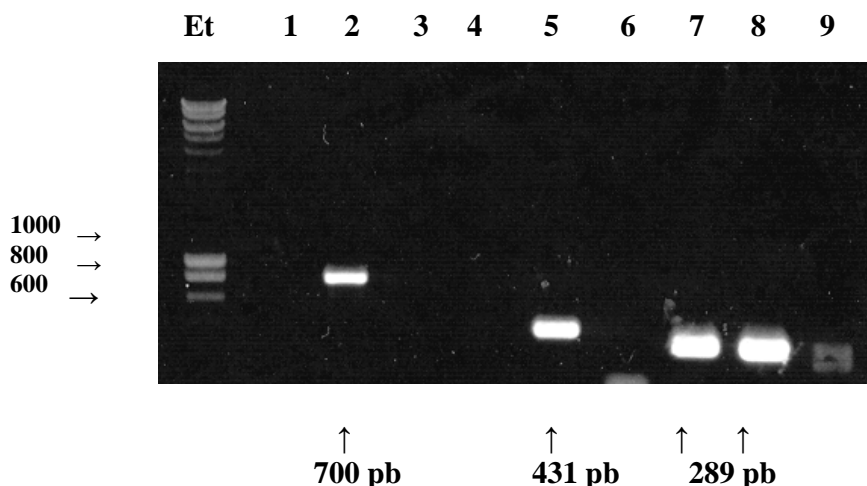


Figure 4.5. : RT-PCR de MEFs +/+ et de MEFs -/-. 1) MEFs -/-, amorces s2Hyal1m et as6 Hyal1m. 2) MEFs +/+, amorces s2Hyal1m et as6 Hyal1m. 3) Blanc. 4) MEFs -/-, amorces LJ-mHyal1s et LJ-mHyal1as. 5) MEFs +/+, amorces LJ-mHyal1s et LJ-mHyal1as. 6) Blanc. 7) MEFs -/-, amorces LJ-GAPDHms et LJ-GAPDHmas. 8) MEFs +/+, amorces LJ-GAPDHms et LJ-GAPDHmas. 9) Blanc. – Et., Étalon SmartLadder.

4.2.2. Détection de la protéine par immunofluorescence

Différents anticorps anti-Hyal 1 ont été testés : un polyclonal de lapin anti-Hyal 1 (Frost), un monoclonal de souris 17E9 (Frost) et un monoclonal de souris 1D10 (Triggs-Raine). La présence de la protéine est visualisée au microscope confocal.

4.2.2.1. Conditions techniques

L'anticorps polyclonal anti-Hyal 1 de Frost a été dilué 1/100 dans du PBS-BSA 3 %, tandis que l'anticorps primaire anti-lapin à fluorescence verte a été dilué 1/500. Le monoclonal anti-Hyal 1 17E9 a été dilué 1/100 également dans du PBS-BSA 3 %, tandis que l'anticorps secondaire, un anticorps anti-souris vert, a été dilué 1/500. Enfin, l'anticorps monoclonal 1D10 anti-Hyal 1 a été dilué 1/100 dans du PBS-BSA 3 %. Le secondaire, un anticorps anti-souris vert a été dilué 1/500. Un marquage des noyaux a été effectué dans toutes les expériences.

4.2.2.2. Résultats et interprétation

Les images d'immunofluorescence de chaque type cellulaire sont montrées dans les **Figures 4.6 et 4.7**. L'enzyme Hyal 1 est marquée en vert. Le marquage des noyaux est visible en bleu.

Malheureusement, l'observation du marquage fluorescent a révélé pour chacun des anticorps testés, une forte intensité de la fluorescence verte tant chez les MEFs -/- que chez les MEFs +/+ (et même plus fortement dans les cellules de souris KO). Ces résultats démontrent une non-spécificité des trois anticorps anti-Hyal 1 testés, et cela pour la technique d'immunofluorescence. Les anticorps secondaires seuls ne sont pas responsables du marquage observé. Cette technique n'a donc pas permis de confirmer ou non la présence de la protéine.

4.2.3. Détection de la protéine par immunoblotting

Un Western Blot a été réalisé afin de visualiser la protéine Hyal 1 dans les homogénats de MEFs +/+ et de MEFs -/- .

4.2.3.1. Conditions techniques

Pour chaque échantillon cellulaire de MEFs -/- et de MEFs +/+, une sonication a été effectuée et différentes concentrations de protéines ont été déposées sur un gel d'acrylamide de 8 %. Deux expériences avec les deux mêmes anticorps primaires anti-Hyal 1 ont été réalisées :

- L'anticorps primaire polyclonal de lapin anti-Hyal 1(Frost) a été dilué 1/2000 dans du PBS-BSA 1 % et l'anticorps secondaire (anti-lapin couplé à l'HRP) a été dilué 1/8000 dans du PBS-BSA 1 %.
- L'anticorps primaire monoclonal anti-Hyal 1 1D10 a été utilisé dans les mêmes conditions que le polyclonal de Frost. Il est reconnu par l'anticorps secondaire anti-souris couplé à une HRP.

Hyal 1 est une protéine de 435 acides aminés. Dans le plasma, sa taille est de 57 kDa, tandis que l'urine contient deux isoformes d'Hyal 1: une protéine de 57 kDa et une autre de 45 kDa (Stern, 2003). L'étalon utilisé est l'étalon Prosieve.

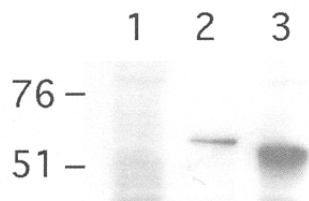
4.2.3.2. Résultats et interprétation

Malgré différentes conditions testées pour le Western Blot, l'expression de la protéine Hyal 1 n'a pu être mise en évidence dans aucun des deux types cellulaires, que ce soit avec l'anticorps 1D10 ou le polyclonal de Frost.

L'hypothèse selon laquelle les anticorps utilisés ne seraient pas valides pour la reconnaissance d'Hyal 1 est à exclure car ceux-ci ont été préalablement testés sur des souris KO en Hyal 1 et des souris WT. Le résultat a montré l'expression d'Hyal 1 à la taille attendue chez les WT mais surtout une perte de son expression dans les souris KO. L'anticorps polyclonal de Frost est utilisé dans les conditions habituelles du laboratoire tandis que le monoclonal 1D10 nécessite une reconnaissance au moyen d'un anticorps secondaire « True Blot ». Cette méthode a été mise au point pour des protocoles mettant en oeuvre des immunodétections de protéines immunoprécipitées. En effet, cette technique permet de détecter préférentiellement la forme native (avec les ponts disulfide) des immunoglobulines, permettant ainsi de ne pas révéler les anticorps présent dans les tissus de la souris. Le « TrueBlot » permet donc de réduire les interférences entre la chaîne lourde (~55 kDa) et la chaîne légère (~23 kDa) des immunoglobulines et nos protéines lors de la révélation du western blot.

Ces résultats sont présentés dans les **Figures 4.8. et 4.9.**

With 1D10 as primary anti-body



1: Mouse KO
2: Rat
3: Mouse WT

} E=7µg proteins

and True Blot™ anti-mouse HRP as secondary anti-body

Figure 4.9. True Blot de l'anticorps 1D10 sur des homogénats de tissus de souris KO, WT et de rat. 7 µg de protéines ont été déposés pour chaque échantillon. L'anticorps 1D10 reconnaît par Cross-réactivité l'enzyme Hyal 1 chez le rat.

4.2.4. Recherche de l'activité hyaluronidasique

Afin de mettre en évidence une éventuelle activité hyaluronidasique dans les MEFs, une zymographie a été réalisée sur des homogénats de MEFs $+/+$ et des MEFs $-/-$. La technique nous donne une idée de la dégradation de l'HA.

4.2.4.1. Conditions techniques

La zymographie a été réalisées sur un gel d'acrylamide 8% contenant 1,7mg/ml d'acide hyaluronique. 75 μ g de protéines de chaque type cellulaire ont été déposés. Le gel a été coloré dans une solution de Stains-all. Afin d'obtenir un contrôle positif de l'expérience, 6.5 μ g de protéines d'homogénats de Cos ont également été déposé sur le gel (non représenté dans ce mémoire). En effet, les Cos sont des cellules qui possèdent une très forte activité hyaluronidasique.

4.2.4.2. Résultats et interprétation

Lors de la visualisation de la zymographie, deux bandes roses au niveau des MEFs $+/+$ ont été observées à une taille se situant entre 48 et 77 kDa (Figure 4.10.). Celles-ci ne sont pas observées chez les MEFs $-/-$. Cela démontrerait une activité hyaluronidasique que l'on ne retrouverait que chez les MEFs $+/+$. On peut donc supposer mais sans certitude que c'est l'action de l'enzyme Hyal 1 qui est exprimé chez les MEFs $+/+$ et qui disparaît chez les MEFs $-/-$.

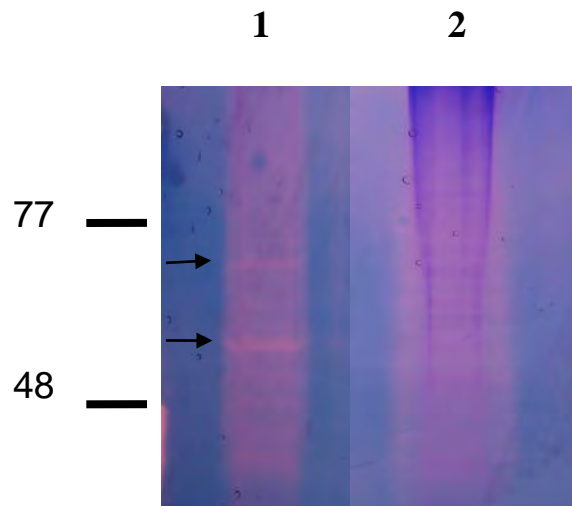


Figure 4.10. : Zymographie sur un gel d'acrylamide de 8%. 1 MEFs $+/+$. 2. MEFs $+/+$. Les flèches noires indiquent la position des deux bandes retrouvées chez les MEFs $+/+$.

Une quantité supérieure de protéines pourrait peut-être nous donner un meilleur signal d'activité mais n'a pas pu être réalisée à cause des limites de la technique et la concentration en protéines dans les homogénats.

4.3. Impact de l'absence d'HYAL 1 sur les mitochondries

4.3.1. Marquage des mitochondries

Le NAO (10-Nonyl acridine Orange) est un marqueur des mitochondries qui se lie aux phospholipides chargés négativement. Il a été utilisé pour obtenir une estimation de la masse mitochondriale dans différents types cellulaires.

4.3.1.1. Conditions techniques

Dans le cadre de ce mémoire, le NAO est utilisé à une concentration finale de 1 μ M dans de l'HBSS complet (voir matériel et méthodes).

4.3.1.2. Résultats et interprétation

Les **Figures 4.11 et 4.12** représentent les cellules MEFs $+/+$ et MEFs $-/-$ marquées au NAO et émettent une fluorescence verte. Le marquage des mitochondries au NAO n'a pas permis de mettre en évidence une différence entre les deux types cellulaires au niveau de la masse mitochondriale. Le contrôle négatif est bien négatif.

Un autre marqueur mitochondrial a été utilisé, le Mitotracker® Red qui est une sonde couplé à un fluorochrome qui se lie aux groupements SH. Il marque spécifiquement les organites qui respirent. Cependant, malgré plusieurs modifications des conditions expérimentales, aucune condition optimale d'utilisation de la sonde n'a pu être déterminée pour les MEFs.

4.3.2. Mesure de la respiration mitochondriale

La mesure de la respiration mitochondriale se fait par la technique d'oxypolarographie. Elle comprend deux parties: l'électrode de Clark qui produit un courant électrique, et un millivoltmètre enregistreur qui va mesurer ce courant. Le courant électrique est assuré par la réduction de l'oxygène et son intensité est proportionnelle à la vitesse de diffusion de ce dernier vers l'électrode, c'est-à-dire à la concentration de l'oxygène dans la solution.

Les **Figures 4.13 et 4.14** représentent un oxypolarogramme montrant le cours de la respiration mitochondriale en présence de phosphate et d'un substrat donneur d'électrons, le succinate. Celui-ci est un pourvoyeur en FADH₂. Son ajout dans le milieu de respiration va augmenter la production d'ATP au sein de la cellule et donc la consommation d'oxygène. Dans la **Figure 4.15**, sont représentées les valeurs du contrôle respiratoire, c'est-à-dire le rapport entre l'intensité respiratoire en présence d'ADP et l'intensité respiratoire en absence d'ADP. L'intensité respiratoire exprime la quantité d'oxygène consommé par unité de temps et de mg de protéines.

4.3.2.1. Résultats et interprétation

- Mesure du contrôle respiratoire :

La mesure de la respiration mitochondriale a révélé qu'une légère augmentation du rapport (contrôle respiratoire) dans les MEFs $-/-$. Les résultats montrent un contrôle respiratoire aux environs de 4 chez les MEFs $+/+$ et de 5 chez les MEFs $-/-$. Un test t non pairé montre que la différence entre les deux types cellulaires n'est pas significative. Ces chiffres sont compris dans la limite normale des contrôles respiratoires habituels d'autres types cellulaires (ex : les levures ont un contrôle respiratoire aux environs de 2).

- Mesure de la consommation d'oxygène sur des cellules non perméabilisées:

La mesure de la respiration de cellules entières peut se faire en ne perméabilisant pas les cellules avec de la digitonine. La digitonine est un puissant détergent possédant la propriété de perméabiliser les membranes en dissolvant le cholestérol. Les résultats sont repris dans le Tableau 4.1.

	MEFs $+/+$	MEFs $-/-$
Consommation de l'oxygène par les cellules sans digitonine	$21,46 \pm 2,39$ N=3	$24,53 \pm 3,58$ N=3

Tableau 4.1. : Tableau reprenant la moyenne de la consommation d'oxygène des MEFs $+/+$ et des MEFs $-/-$ non perméabilisées avec leur écart-type. N représente la nombre d'échantillons dosés.

L'analyse de ces résultats montrent que les MEFs $+/+$ et les MEFs $-/-$ respirent plus ou moins de la même façon sans perméabilisation de la cellule avec l'ajout de succinate.

4.3.3. Dosage de la cytochrome oxydase

Pour déterminer l'abondance relative des mitochondries présentes, un dosage enzymatique de la cytochrome oxydase a été effectué. Cette enzyme fait partie du complexe IV de la chaîne respiratoire. Elle catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction qui réduit l'oxygène en eau par quatre électrons.

Les résultats de ces dosages sont repris dans la **Figure 4.16**. Ils représentent les moyennes des activités spécifiques des enzymes (U/mg de protéines).

4.3.3.1. Résultats et interprétation

L'analyse de l'activité spécifique de la cytochrome oxydase montre une activité légèrement supérieure pour les MEFs +/+, mais avec un écart-type très important. Les statistiques effectuées par test t non païré montrent que les différences les deux types cellulaires ne sont pas significatives (**Figure 4.16.**). Cette absence de différence peut être en partie expliquée par un nombre d'échantillon n trop faible (n=4) pour obtenir une comparaison rigoureuse mais semble d'autres part corroborer les autres résultats dans le sens où l'on n'observe pas de différence entre les MEFs +/+ et les MEFs -/- au niveau de la masse mitochondriale et de son activité.

4.4. Impact de l'absence d'HYAL 1 sur les lysosomes

4.4.1. Marquage des vésicules acide au LysoTracker®

Afin de préciser un éventuel impact sur les lysosomes, l'utilisation du LysoTracker®Red a été requise. Il s'agit d'une sonde qui marque spécifiquement les vésicules de pH acide comme les lysosomes mais également les autres organites acides comme les endosomes précoces.

4.4.1.1 conditions techniques

Le LysoTracker®Red est utilisé à une concentration finale de 500 nM dans du milieu de culture DMEM complet. Il donne un marquage rouge aux vésicules acides. Les **Figures 4.17 et 4.18.** représentent ces résultats.

4.4.1.2. Résultats et interprétation

La comparaison de ces images permet de mettre en évidence un marquage plus prononcé chez les MEFs -/- que chez les MEFs +/+. Ce premier résultat pourrait donc signifier une différence au niveau des lysosomes.

4.4.2. Marquage en immunofluorescence des lysosomes

Afin de cibler plus spécifiquement les lysosomes, un anticorps de rat anti-Lamp 1 a été utilisé. En effet, la protéine Lamp-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type I localisée dans les lysosomes et dans les endosomes tardifs. C'est un marqueur lysosomal couramment utilisé.

4.4.2.1. Conditions techniques

L'anticorps anti-lamp1 a été utilisé dilué 1/250 dans du PBS-BSA 3 % et l'anticorps secondaire anti-rat rouge a été dilué 1/500 dans du PBS-BAS 3 %. Un marquage des noyaux a été également réalisé avec du TO-PRO (1/80).

4.4.2. Résultats et interprétation

Les résultats de ce marquage sont présentés dans les **Figures 4.19., 4.20. et 4.21** La fluorescence rouge représente le marquage de Lamp 1 tandis que la fluorescence bleue représente les noyaux.

La comparaison des Figure 4.19 et 4.20. permet de mettre en évidence un marquage plus prononcé de Lamp 1 au niveau des MEFs -/-. Il semble qu'on puisse observer un nombre plus important de lysosomes ou des lysosomes plus volumineux.

On peut donc émettre l'hypothèse que les vésicules qui caractérisent le phénotype des MEFs -/- soient d'origine lysosomale. La Figure 4.21 représente un contrôle négatif de l'anticorps secondaire anti-rat « Rouge » qui est bien négatif.

4.4.3. Western blot

Le Western Blot va nous permettre de mettre en évidence la protéine Lamp-1 au niveau d'homogénats cellulaires de MEFs +/+ et de MEFs -/-

4.4.3.1 Conditions expérimentales

Pour chaque échantillon cellulaire, 20 µg de protéines de MEFs +/+ et de MEFs -/- ont été déposés sur un gel d'acrylamide de 8 %. L'anticorps primaire anti-Lamp 1 a été dilué 1/2000 dans la PBS-BSA 1 % et l'anticorps secondaire a été dilué 1/8000 dans du PBS-BSA 1 %.

La taille de Lamp 1 glycosylée attendue se situe au environ de 110 kDa. L'étalon utilisé est l'étalon Prosieve.

4.4.3.2. Résultats et interprétation

Comme décrit précédemment, Lamp 1 est une glycoprotéine membranaire se trouvant dans les lysosomes. Il existe deux formes de Lamp 1 : la forme glycosylée de 110 kDa et la forme non glycosylée de 42 kDa.

La **Figure 4.22** montre une bande aux environs de 110 kDa visualisée chez les MEFs -/-. Ce résultat démontre qu'il y a plus de protéine Lamp 1 dans les homogénats de MEFs -/- que dans les MEFs +/+. Nous n'avons pas pu obtenir une meilleure image car Lamp 1 est une protéine difficile à transférer. Nous n'avons pas eu le temps affiner cette technique. L'observation des membranes colorées au Rouge Ponceau (non présenté dans ce mémoire) a montré une même quantité de protéines sur les deux pistes. Cela confirme les résultats obtenus par immunofluorescence qui montraient une probable augmentation des lysosomes chez les MEFs -/-.

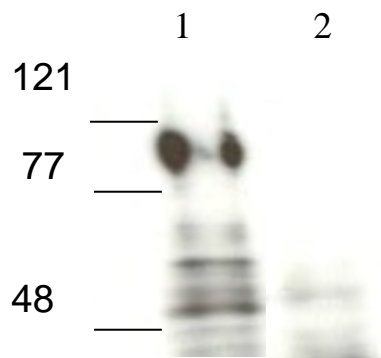


Figure 4.22. : Western Blot avec l'anticorps anti-Lamp 1 (1/2000) sur homogenats de MEFs. 20 μ g de protéines ont été déposés. 1. MEFs +/+. 2. MEFs -/-.

4.4.4. La coloration de Gomori en MET

Dans la continuité de notre hypothèse, une nouvelle étude en MET a été effectuée en y ajoutant un marquage des phosphatases acides. Celles-ci sont des hydrolases qui catalysent la déphosphorylation d'esters organiques et dont le pH d'activité optimale est inférieur à 7. Elles possèdent également une activité transférasiqque, assurant le transfert d'un phosphate sur le groupement hydroxyle d'un alcool. Les phosphatases acides sont localisées dans les lysosomes. La coloration de Gomori permet de mettre en évidence, par la formation de précipités, les lysosomes à l'intérieur du cytoplasme. Les conditions expérimentales sont décrites dans le matériel et méthode. Les images de la MET avec ou sans coloration de Gomori sont représentées dans les **Figures 4.23 et 4.24**.

Un dosage de la phosphatase acide sur des homogénats de MEFs +/+ et de MEFs -/- a également été effectué afin de préciser l'activité spécifique de cette enzyme au sein des deux types cellulaires, en complément à la coloration de Gomori. Ces résultats sont représentés en activité spécifique (mU/mg de protéine) dans le **tableau de la Figure 4.25**.

4.4.4.1. Résultats et interprétation

La comparaison des images de MEFs +/+ avec ou sans coloration de Gomori a permis de valider la méthode puisqu'on peut clairement voir l'apparition de précipités noirs logés à l'intérieur d'organites pour les cellules ayant été colorées au Gomori. Les lysosomes y sont plus petits.

Par contre, pour les MEFs -/-, les vésicules sont dès le départ très denses et donnent déjà un aspect foncé. La coloration de Gomori a révélé ces mêmes vésicules denses sans différence entre le témoin et la coloration.

Si l'on considère que la technique, effectuée dans les mêmes conditions que dans les MEFs +/+, doit également avoir fonctionné dans les MEFs -/-, cette étude apporte un argument supplémentaire sur l'origine lysosomale des vésicules denses aux électrons observées au début de ce travail.

La mesure de l'activité spécifique de la phosphatase acide a montré qu'il y avait un peu plus d'activité chez les MEFs -/- que chez les MEFs +/+. Cela confirme que la coloration de Gomori a pu se dérouler de la même manière dans les deux cas.

4.4.5. Dosages des enzymes lysosomales

Afin d'évaluer l'activité des lysosomes, quatre enzymes lysosomales ont été dosées : la β -galactosidase, la β -glucosidase acide, l'hexosaminidase et la β -glucuronidase. La β -galactosidase est une enzyme lysosomale qui résiste bien à la décongélation/congélation. Elle est adressée au lysosome par la voie dépendante du mannose-6-phosphate. La glucosidase acide est une enzyme qui est, quant à elle, adressée au lysosome par la voie indépendante du mannose-6-phosphate.

Les résultats de ces dosages sont repris dans la **Figure 4.26**. Ils représentent les moyennes des activités spécifiques des enzymes (mU/mg de protéines).

4.4.5.1. Résultats et interprétation

L'analyse de l'activité spécifique de la β -galactosidase montre une diminution d'activité dans les MEFs -/- par rapport aux MEFs +/+. Des tests t non pairée effectués sur ces homogénats montrent que cette différence est hautement significative, à $p < 0.0001$.

Le dosage de la glucosidase acide a également été effectué. A la différence des résultats obtenus pour la β -galactosidase, une légère augmentation son activité spécifique apparaît chez les MEFs -/-. Cependant, cette différence n'est pas significative. Cette constatation a été observée dans d'autres types cellulaires où l'activité spécifique de la glucosidase acide allait dans le sens opposé de la β -galactosidase.

L'analyse de la β -glucuronidase a montré une différence en faveur des MEFs +/+ avec un p de 0.06, c'est-à-dire très proche de la signification statistique habituellement acceptée.

En revanche, les résultats du dosage de l'hexosaminidase ont montré une augmentation d'activité chez les MEFs +/+. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative et ne doit donc pas être retenue dans les conclusions.

4.5. Etude de l'équipement enzymatique des différents organites par centrifugations

4.5.1. Fractionnement complet des MEFs +/+ et des MEFs -/-

Le fractionnement subcellulaire d'un homogénat cellulaire nous permet de séparer les organites en fonction de leur taille. L'étude de l'activité de différents marqueurs enzymatiques tels que ceux utilisés pour l'étude des homogénats permet d'évaluer l'enrichissement des fractions E, N, M, L, P et S en différents organites.

Les **Figures 4.27 et 4.28.** représentent les profils de distribution des activités spécifiques relatives des différentes enzymes, sous forme d'histogrammes, avec en ordonnée l'activité spécifique relative (ASR) et en abscisse le pourcentage de protéines cumulées. Chacune des 6 fractions est donc représentée par un rectangle dont la hauteur est proportionnelle à la purification de l'enzyme ; la base, à la quantité de protéines totales présentes dans chaque fraction ; et la surface totale, au contenu relatif en enzyme de la fraction.

4.5.1.1. Résultats et interprétation

Afin de normaliser le plus possible cette étude, les fractionnements ont été reproduits. Un fractionnement de MEFs +/+ et de MEFs -/- représentant au mieux les résultats obtenus ont été repris dans ce mémoire.

La comparaison du dosage de la β -galactosidase, la glucosidase acide, l'hexosaminidase et la β -glucuronidase pour les MEFs +/+ et les MEFs -/- de chaque fractionnement ne montre pas de différence entre les deux types cellulaires. Malgré une diminution d'activité spécifique relative des MEFs -/- au niveau de la fraction L, celle-ci est compensée par une augmentation de la proportion des protéines dans cette fraction L. Les valeurs nominales sont reprises dans le **Tableau Annexe 1.**

La cytochrome oxydase, marqueur des mitochondries, ne présente pas de maximum d'activité dans la fraction M dans les deux types cellulaires. Ceci laisse supposer que les mitochondries des fibroblastes sont de taille inférieure à la normale. Ces résultats concordent avec ceux de Tulkens (1974) sur des fibroblastes d'embryon de rat.

La comparaison générale des différentes enzymes permet de mettre en évidence une différence au niveau du pourcentage des protéines des fractions N des deux types cellulaires. La fraction N de MEFs -/- est plus grande que celle des MEFs +/+. Cela peut être expliqué par le fait que les MEFs +/+ ont une résistance à l'homogénéisation plus élevée que les MEFs -/-. Le matériel des noyaux pourrait donc être libéré plus rapidement dans les MEFs -/-, donnant ainsi une valeur en protéines plus élevée. De plus, il est observé en immunofluorescence que le rapport des proportions noyau /cytoplasme est beaucoup plus élevé chez les MEFs -/-.

4.5.2. Analyse de la densité des organites des MEFs +/+ et des MEFs -/- par centrifugation isopycnique et migration sur des gradients.

Pour affiner les résultats obtenus lors des fractionnements complets, nous avons soumis la fraction ML ou MLP à une centrifugation isopycnique en gradient de saccharose, Nycodenz et Percoll.

Le principe de cette technique est la séparation des organites en fonction de leur densité par rapport à la densité du solvant. Sous l'effet du champ centrifuge, les organites s'équilibrent dans le gradient lorsque la densité du milieu est égale à leur propre densité.

4.5.2.1. Gradient de saccharose

Le saccharose est un solvant très souvent utilisé. Il permet d'atteindre des densités assez élevées, de l'ordre de 1,3 g/ml avec du saccharose 0,25 M. Ce produit est électriquement neutre et plutôt inerte pour la plupart des fractions cellulaires. Son principal défaut est sa viscosité à forte concentration qui nécessite une force centrifuge très importante. De plus, ces composés développent un effet osmotique non négligeable.

Dans le cadre de ce mémoire, la fraction MLP a été soumise au gradient de saccharose 0,25 M. L'analyse des activités enzymatiques a été effectuée sur les 13 coupes du gradient afin d'obtenir une distribution des différents organites.

La **Figure 4.29** représente les différentes distributions des activités enzymatiques. Chacune des fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur représente la fréquence (c'est-à-dire le rapport entre le pourcentage d'activité enzymatique dans chaque fraction et la différence de densité entre le début et la fin d'activité enzymatique de cette même fraction). La base, quant à elle, représente la densité de la fraction (g/ml). Les pourcentages de récupération de chaque enzyme ainsi que les médianes sont repris dans les tableaux de la **Figure 4.29**.

4.5.2.1.1. Résultats et interprétation

Le profil de distribution de l'activité du marqueur lysosomal (la β -galactosidase) en fonction des fractions est normal. En effet, au fil de densité, la fréquence augmente graduellement jusqu'à atteindre un pic aux environs de la 7-8^{ème} fraction. Cette allure est reproduite dans le cas des MEFs +/+ mais également au niveau des MEFs -/- pour la plupart des enzymes lysosomales ou mitochondriales. La β -galactosidase des MEFs -/- s'équilibre à une densité supérieure à celle des MEFs +/+, tandis que la cytochrome oxydase des MEFs -/- s'équilibre à une densité inférieure à celle des MEFs +/+. Cependant, aucune conclusion ne peut être émise par l'observation de ce gradient car les différences sont minimales.

Les résultats obtenus pour le dosage de la glucosidase acide, de l'hexosaminodase et de la β -glucuronidase ne sont pas présentés car les pourcentages de récupération se situaient en-dehors de la limite fiable.

4.5.2.2. Gradient de Nycodenz

Le Nycodenz, est très soluble et non chargé. Il permet d'atteindre des densités assez fortes, de l'ordre de 1,46. Son principal avantage sur le saccharose est qu'il est relativement visqueux. Dans le cadre de ce mémoire, la fraction MLP a été soumise au gradient de Nycodenz. L'analyse des activités enzymatiques a été effectuée sur 13 coupes du gradient afin d'obtenir une distribution des différents organites.

La **Figure 4.30** représente les différentes distributions des activités enzymatiques. Comme pour le saccharose, chacune des fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur représente la fréquence et la base, la densité de la fraction (g/ml). Les pourcentages de récupération de chaque enzyme ainsi que les médianes sont repris dans les tableaux de la **Figure 4.30**.

4.5.2.2.1. Résultats et interprétation

La distribution de chaque enzyme lysosomale dosée, pour les MEFs -/- comme pour les MEFs +/+, est habituelle. C'est-à-dire que la répartition des fractions s'effectue avec un pic au environ de la 3-4^{ème} fraction. Au sein d'une même souche cellulaire, les deux enzymes lysosomales sont assez bien superposées. Pour chacun des types cellulaires, on n'observe pas de réelle différence de médianes pour les MEFs -/- par rapport aux MEFs +/+.

Pour la répartition de la cytochrome oxydase, on retrouve trois pics élevés, ce qui ne correspond pas à une configuration normale. Aucune conclusion ne sera donc tirée de ce gradient pour la cytochrome oxydase.

4.5.2.3. Gradient de Percoll

Le Percoll est une substance contenant des particules de gel de silice recouvertes de polyvinylpyrrolidone. Cela permet de produire des densités de l'ordre de 1,3 g/ml tout en maintenant de faibles pressions osmotiques et de faibles viscosités. Dans le cadre de ce mémoire, la fraction ML a été soumise au gradient Percoll. L'analyse des activités enzymatiques a été effectuée sur les fractions qui en résultent, afin d'obtenir une distribution dans différents organites.

Le **Figure 4.31** représente la différente distribution de l'activité enzymatique. Chacune des fractions est représentée par un rectangle dont la hauteur représente la fréquence et la base, la densité de la fraction (g/ml). Les pourcentages de récupération de chaque enzyme ainsi que les médianes sont repris dans les tableaux de la Figure 4. 31.

4.5.2.3.1. Résultats et interprétation

La distribution attendue dans un gradient Percoll est la même que pour le gradient Nycodenz, c'est-à-dire un pic au environ de la 3-4^{ème} fraction. L'analyse de la distribution générale obtenue à la suite du dosage des différentes enzymes lysosomales n'a révélé aucune différence entre les MEFs +/+ et les MEFs -/-. L'analyse des médianes montre, pour pratiquement toutes les enzymes lysosomales, une superposition de la densité d'équilibration. Les résultats obtenus pour le dosage de la cytochrome oxydase ne sont pas présentés car les pourcentages de récupération se situaient en-dehors de la limite fiable.

5. Conclusions et perspectives

L'objectif de ce mémoire était d'apporter des renseignements d'un point de vue physiologique et biochimique sur les conséquences d'une mutation de HYAL 1 dans le cas de cellules embryonnaires fibroblastiques de souris déficientes en HYAL 1 (MEFs -/-). L'observation initiale au microscope optique (MO) et au microscope électronique à transmission (MET) avait montré l'apparition de larges vésicules denses aux électrons remplissant le cytoplasme des cellules KO. La nature de ces vésicules ne peut être déterminée de façon précise, mais leur origine lysosomale est fortement soupçonnée. En effet, la localisation subcellulaire de HYAL 1 est assez controversée dans la littérature. Des arguments en faveur de la localisation lysosomale de l'enzyme HYAL 1 sont le pH optimal acide de l'enzyme, compris entre 3.5 et 3.8, et le fait que sa déficience plasmatique provoque une maladie de surcharge de type lysosomale (quoique atypique), la mucopolysaccharidose IX (Triggs-Raine, 1999). Cependant, HYAL 1 présente parfois un comportement entrant en conflit avec une localisation lysosomale. Citons notamment sa solubilisation dans le plasma par le Triton X-114. Le manque d'information sur la localisation subcellulaire de HYAL 1 se répercute sur l'étude de sa biosynthèse et de son importance métabolique. D'où l'objectif de ce mémoire.

Après la vérification du génotype des MEFs, l'étude de l'impact de l'absence de HYAL 1 sur les différents organites qui composent les cellules des MEFs -/- a été réalisée. Pour effectuer ces analyses, des comparaisons furent réalisées entre les MEFs KO en HYAL 1 et des MEFs provenant de souris WT (MEFs +/+).

Des méthodes comme l'immunofluorescence et l'utilisation de sondes fluorescentes ont été utilisées afin de visualiser la répartition de ces deux organites au sein de la cellule, tandis que des analyses biochimiques ont permis d'avoir une idée sur leur activité enzymatique et sur la biogenèse de leur enzyme. Les résultats ainsi obtenus ont été complétés par des analyses plus spécifiques à l'organite, à savoir, pour les mitochondries, la mesure de la respiration cellulaire et, pour les lysosomes, le marquage de la phosphatase acide en MET.

Suite aux expériences réalisées lors de ce mémoire, et aux résultats préliminaires qu'elles ont produits, certaines conclusions peuvent être tirées:

- *Aspect morphologique des MEFs +/+ et des MEFs -/-*

Alors que les MEFs +/+ ont un aspect allongé avec des prolongements, comme la plupart des fibroblastes, les MEFs -/- ont des prolongements moins définis. Leur noyau est plus volumineux et des granules apparaissent en MO et en MET.

- *Caractérisation de l'outil*

Bien que la RT-PCR ait pu démontrer sans équivoque que HYAL 1 n'est pas exprimé chez les MEFs $-/-$, l'analyse de l'expression de sa protéine est beaucoup plus houleuse. En effet, le Western blot n'a pas permis pas de mettre en évidence la protéine dans les MEFs $+/+$. Le marquage par immunofluorescence de HYAL 1 n'apporte pas de résultats interprétables vu le caractère non spécifique du marquage. La zymographie, quant à elle, met en évidence une différence entre les deux types cellulaires puisqu'une activité très nette (2 bandes roses) est observée dans les MEFs $+/+$ mais pas dans les MEFs $-/-$.

- *Impact de l'absence d'HYAL 1 sur les mitochondries des MEFs $-/-$*

Les résultats obtenus à la suite de la caractérisation des mitochondries dans les MEFs $-/-$ ne semblent pas révéler de modification significative, que ce soit au niveau de la masse mitochondriale ou au niveau de son activité au sein de la cellule.

La mesure de la respiration mitochondriale a révélé que les MEFs $-/-$ ont une respiration cellulaire légèrement plus élevée que les MEFs $+/+$. Cependant, cette différence n'est pas statistiquement significative et nous ne pouvons pas la retenir ici. La même constatation est observée pour la comparaison des deux types de MEFs marquées au NAO : pas de différence significative.

En ce qui concerne l'analyse du dosage de la cytochrome oxydase effectuée sur les homogénats cellulaires, un léger déficit de la cytochrome oxydase est obtenu dans les MEFs des souris KO. Les fractionnements complets sur lesquels est dosée la cytochrome oxydase montrent un pic de l'activité dans la fraction L, tant pour les MEFs $+/+$ que pour les MEFs $-/-$. On peut considérer ce résultat comme habituel des fibroblastes embryonnaires. Pour terminer, l'étude des différents gradients n'a pas montré de différence significative.

Cette constatation va dans le sens des recherches effectuées précédemment sur HYAL 1. En effet, aucune publication n'a pu démontrer jusqu'à présent l'implication de cette enzyme dans les fonctions mitochondriales.

- *Caractérisation des lysosomes des MEFs $+/+$ et des MEFs $-/-$*

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus dans ce mémoire, on peut suggérer un possible rôle de HYAL 1 au niveau des lysosomes.

En effet, le marquage des lysosomes par Lamp 1 et par le LysoTracker® est concordant, dans la mesure où les lysosomes des MEFs $-/-$ sont non seulement plus volumineux mais également plus nombreux que chez les MEFs $+/+$. L'observation de l'activité enzymatique de différentes enzymes lysosomales sur des homogénats cellulaires montre un léger déficit pour les MEFs $-/-$, déficit qui est hautement significatif pour la β -galactosidase. Au niveau des fractionnements complets, un pic de la fraction L y est observé mais avec une activité spécifique relative plus basse que chez les MEFs $+/+$.

L'étude des différents gradients ne montre pas de différence dans la distribution des différentes fractions. Enfin, la coloration de Gomori met en évidence une similarité de ces vésicules avec les lysosomes, confirmée par le dosage de la phosphatase acide.

A la lumière de l'ensemble de ces résultats, il semble que le gène HYAL 1 n'interviendrait pas de façon directe sur les mitochondries. Le phénotype observé chez les MEFs KO en HYAL 1 pourrait donc résulter d'un effet direct ou indirect sur le fonctionnement des lysosomes.

L'analyse approfondie des images de MET a permis de révéler un grand nombre de corps myéloïdes (ou myélinosomes) marqués par la coloration de Gomori. Ces structures pléomorphiques, qui présentent une diversité infinie de formes, se rencontrent dans de nombreux types cellulaires. Ce sont à l'origine des organites (mitochondries, RER,...) en dégénérescence qui fusionnent avec des lysosomes pour être détruits et/ou recyclés. La taille de ces myélinosomes chez les MEFs -/- semble beaucoup plus élevée à ceux des MEFs +/+ (**Figure 5.1**). Une quantification de la taille de ces myélinosomes pourrait se révéler intéressante à l'avenir.

Une augmentation du nombre et de la taille des myélinosomes pourrait résulter d'une accumulation causée par une anomalie fonctionnelle touchant les lysosomes. La déficience hautement significative de la β -galactosidase dans les MEFs -/- conforte cette hypothèse.

L'absence du gène HYAL 1 semble donc provoquer une modification de l'apparence des lysosomes créant un certain dysfonctionnement. Les lysosomes plus volumineux et plus nombreux que la normale deviendraient denses aux électrons à cause d'une surcharge de matériel non dégradé qui s'accumule à l'intérieur de ceux-ci. Connaissant l'implication de HYAL 1 dans la dégradation de l'HA (Csoka *et al.*, 2001), l'éventualité d'une accumulation de ce GAG dans les lysosomes est certes envisageable.

Un cas humain présentant une maladie de surcharge lysosomale fut décrit par Natowicz en 1996. Cette maladie fut nommée mucopolysaccharidose du type IX. Des macrophages surchargés en HA furent observés dans divers tissus de l'organisme de ce patient, avec également une absence complète d'activité HYAL 1 circulante. L'étiologie de cette maladie résulte de mutations dans le gène HYAL 1, lesquelles provoquent une inactivation de l'enzyme et la non dégradation de l'HA (Triggs-Raine *et al.*, 1999).

Quelles sont les perspectives possibles pour ce travail?

Tout d'abord, il serait nécessaire de répéter les expériences effectuées dans ce mémoire avec des MEFs KO en HYAL 1 et des MEFs WT provenant de la même lignée cellulaire et ayant été immortalisées exactement de la même façon.

Il serait également nécessaire de trouver les conditions optimales de Western Blot car même au niveau des MEFs +/+, l'enzyme HYAL 1 n'est pas visualisée. Cela dépend bien entendu de la possibilité d'obtenir un anticorps efficace pour ce genre de technique. Aucun anticorps de ce type n'étant commercialement disponible, une amélioration de la technique nécessiterait probablement la production de nouveaux anticorps. En revanche, la zymographie semble confirmer l'existence d'une activité hyaluronidasique spécifique des MEFs WT. Pour remplacer le Western Blot, une expérience de transcription/traduction in vitro peut être envisagée.

Au vu du phénotype des MEFs -/-, il serait intéressant de transfecter dans ces cellules un plasmide contenant le gène HYAL 1 et d'observer une éventuelle transformation du phénotype de la cellule en MEFs +/+. Cela confirmerait l'importance de l'implication de HYAL 1 dans le phénotype cellulaire.

Dans le cadre de l'hypothèse où l'on serait face à un cas rare de maladie de surcharge lysosomale, il serait intéressant d'effectuer différentes analyses sur la nature d'une éventuelle surcharge. Dans le cas de l'étude des MEFs déficiente en HYAL 1, la première idée serait d'observer la répartition de l'HA au sein de la cellule. Puisqu'il n'est pas possible d'obtenir un anticorps contre l'acide hyaluronique, l'utilisation de l'HABP (Hyaluronic acid binding protein) couplée à une biotine est requise. Une streptavidine couplée à un fluorochrome reconnaîtra la biotine et permettra le marquage de l'HA dans la cellule. Si notre hypothèse et les conditions techniques sont bonnes, on devrait voir apparaître chez les MEFs KO des zones où l'HA s'accumulerait. La recherche d'une possible colocalisation avec les lysosomes, par exemple via un marqueur lysosomal comme Lamp 1, sera alors envisageable.

En parallèle, il serait intéressant de répéter les études biochimiques effectuées jusqu'à présent afin de standardiser les résultats et de pouvoir faire une étude statistique fiable sur un nombre d'échantillon plus grand, ainsi que d'augmenter le panel des enzymes à doser.

L'observation d'organes de l'animal KO en HYAL 1 pourrait être réalisée afin de les comparer avec les résultats obtenus pour les MEFs.

Afin d'éliminer complètement une implication d'HYAL 1 dans le fonctionnement des mitochondries, des analyses supplémentaires se rapportant à l'activité de ces organites devraient être effectuées. Ainsi, l'observation du potentiel de membrane mitochondrial à l'aide d'une sonde JC-1 pourrait apporter des renseignements évocateurs. De même que l'augmentation du panel des enzymes mitochondriales à tester pourrait conforter les résultats obtenus pour la cytochrome oxydase. L'utilisation d'un anticorps contre les sous-unités des complexes de la phosphorylation oxydative pourrait être intéressante pour obtenir des renseignements sur la biogenèse mitochondriale et l'étude des maladies liées à la phosphorylation oxydative.

Enfin, l'étude des autres hyaluronidases, en particulier HYAL 2, serait intéressante car plusieurs hypothèses impliquent l'enzyme HYAL 2 dans la dégradation de l'HA. Une étude de la présence et de l'activité de cette enzyme dans les MEFs +/- grâce à des techniques comme le Western blot ou la zymographie apporterait peut-être des informations intéressantes. Ce mémoire est donc une première piste sur l'exploration du rôle précis des hyaluronidases cellulaires, enzymes méconnues jusqu'à présent.

6. Bibliographie

Appelmans, F., Wattiaux, R and De Duve, C. Tissue fractionation studies 5 : The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver. *Biochem.J.* **59**, 438-445 (1955).

Brady RO. Enzymatic defects in the sphingolipidoses. *Adv Clin Chem.* **11**,1-19. Review (1969).

Braulke Thomas. Subcellular Biochemistry: *Biology of lysosome*, edited by Lloyd. Press, New York, Volume 27. (1996)

Chang NS. Transforming growth factor-beta1 blocks the enhancement of tumor necrosis factor cytotoxicity by hyaluronidase Hyal-2 in L929 fibroblasts. *BMC Cell Biol* **3**:8. (2002).

Chen ,W.Y.J. and Abatangelo. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound repair Regen* **7**,79-89. (1999)

Cherr, GN, Yudin, and Overstreet, JW .The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix biol.* **20**, 515-525 (2001).

Csoka AB, Frost GI, Heng HH, Scherer SW, Mohapatra G, Stern R. The hyaluronidase gene HYAL1 maps to chromosome 3p21.2-p21.3 in human and 9F1-F2 in mouse, a conserved candidate tumor suppressor locus. *Genomics* 48(1):63-70 (1998). Erratum in: *Genomics* 84(1):227 (2004).

Csoka AB, Scherer SW, Stern R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* 60(3):356-61 (1999).

Csoka A.B. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology* **20**, 499-508 (2001).

DeAngelis, PL. Hyaluronansynthase: fascinating glycosyltransferases from vertebrates, bacterial pathogens, and alga viruses. *Cell.Mol.Life Sci.* **56**, 670-682 (1999).

De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F. Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissues. *Biochem. J.* **60**, 604-617 (1955).

Dittmer Frank, Eva J. Ulbrich, Angela Hafner, Wolfgang Schmahl, Tobias Meister, Regina Polhmann and Kurt von Figura. Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. *Journal of science* **112**, 1591-1597 (1999)

Eskelinen, E.L., Tanaka, Y. and Saftig,P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell biol.* **13**, 137-145 (2003).

Evanko, S. P., J. C. and Wight, T. N. Formation of hyaluronan-and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler.Vasc.Biol.* **19**, 1004-1013 (1999).

Fischer-Szafarz B. Hyaluronidase polymorphism detected by polyacrylamide gel electrophoresis. Application to hyaluronidases from bacteria, slime molds, bee and snake venoms, bovine testes, rat liver lysosomes, and human serum. *Anal Biochem.* **143**, 76-81 (1984).

Frost, Csoka, Wong and Robert Stern. Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase. *Biochemical and biophysical research communications* **236**, 10-15 (1997).

Frost, Mohopatra, Wong, Csoka, Gray and Robert Stern. HYAL1/LUCA-1, a candidate tumor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head end neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA. *Oncogene* **19**, 870-878 (2000).

Ginetzinsky AG. Role of hyaluronidase in the re-absorption of water in renal tubules: the mechanism of action of the antidiuretic hormone. *Nature* **182**, 1218-9 (1958).

Gonzalez-Noriega, Ortega Cuellar, Michalak. 78kDa receptor for Man6P-independent lysosomal enzyme targeting: biosynthetic transport from endoplasmic reticulum to "high-density vesicles". *Experimental cell research* **312**(7), pp 1065-75 (2006).

Hascall Vincent C. and Laurent Torvard C. Hyaluronan: structure and physical properties (1997).

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html>

Knudson W. and Knudson C.B. The hyaluronan receptor, CD44 (1998).
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA10/HA10E.html>

Kobayashi, T, Beuchat, M.H, Lindsay, M, Frias S, Palmiter, R.D., Sakuraba, H, Parton, R.G, and Gruenberg, J. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nature Cell Biology* **1**, 113-118 (1999).

Kornfeld, S .Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states, *J. Clin. Invest.* **77**, 1-6 (1986).

Kornfeld Stuart. Trafficking of lysosomal enzymes, *FASED. J.* **1**, 462-468 (1987).

Kornfeld, R., Bao, M., Brewer, K., Noll, C. and Canfield, W. Molecular cloning and functional expression of two splice forms of human N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase. *J.Biol.Chem.* **277**, 32778-32785 (1999).

Lieberman Raquel L, Brandon A Wustman, Pedro Huertas, Allan C Powe, Jr, Corey W Pine, Richie Khanna, Michael G Schlossmacher, Dagma Ringe and Gregory A Petsko. Structure of acid β -glucosidase with pharmacological chaperone provides insight into Gaucher disease, *Nature chemical Biol*, Vol **3**, number 2 (2007).

Logan DC. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot.* **57**(6),1225-43. Review (2006).

Lokeshwar, Cerwinka and Lokeshwar L. HYAL 1 hyaluronidase: a molecular determinant of bladder tumor growth and invasion. *Cancer Research.* **65**, pp.2243-2250 (2005).

Longaker, M.T., Chiu, E.S., Adzick, N.S. Stern, M., Harrison, M.R., and Stern Ann. Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid. *Ann. Surg.* **213**, 292-6 (1991).

Magalhaes, PJ., Andreu, AL, Schon EA, Evidence for the presence of 5 S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol Biol Cell* **9**, 2375-2382 (1998).

Martin-DeLeon Patricia A. Epididymal SPAM1 and its impact on sperm function. *Molecular and cellular Endocrinology*, **250**, 114-121 (2006).

Meyer. Hyaluronidases. In: *The enzymes (Third ed)*. Boyer P.D., Ed. Academic. Press New York: 307-320 (1971)

Natowicz, M. R., Short, M. P., Wang, Y., Dickersin, G. R., Gebhardt, M. C., Rosenthal, D. I., Sims, K. B. and Rosenberg, A. E. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N. Engl. J. Med* **335**, 1029-1033 (1996).

Neufeld. Natural History and Inherited Disorder of a lysosomal enzyme, bêta-hexosaminidase. *J. Biol.Chem.* vol **264**, no.19,pp. 10927-10930 (1989).

Novak U, Stylli SS, Kaye AH, Lepperdinger G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res.* **59**(24), 6246-50 (1999).

Peters, T.J. Müller, M. & de Duve, C. Lysosomes of arterial wall. *J. Exp.Med.* **136**, 1117-1139 (1972).

Rai SK, Duh FM, Vigdorovich V, Danilkovitch-Miagkova A, Lerman MI, Miller AD. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8), 4285-7 (2001).

Rohrer and Kornfeld R. Lysosomal hydrolase Mannose-6-Phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network. *Molecular Biology of the cell* **12**, 1623-1631 (2001).

Sano R, Trindade VM, Tessitore A, d'Azzo A, Vieira MB, Giugliani R, Coelho JC. G(M1)-ganglioside degradation and biosynthesis in human and murine G(M1)-gangliosidosis. *Clin Chim Acta.* 354(1-2), 131-9 (2005).

Scott, J.E. Secondary in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. The biology of hyaluronan. *Ciba Foundation Symposium* No. **143**, 6-14 (1989).

Scott, J.E. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution some biological consequence. (1998).

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>

Seglen P.O. Effects of amino acids, ammonia and leupeptin on protein synthesis and degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochem.j.* **174**.469-474. (1978)

Shuttleworth, Wilson, Wicklow, Wilkins and Triggs-Raine. Characterization of the murine hyaluronidase gene region reveals complex organization and cotranscription of Hyal 1 with Downstream genes, Fus 2 and Hyal 3. *J.Biol.Chem.*, vol **277** (2002).

Spicer Andrew and McDonald John. Eukaryotic hyaluronan synthases (1998)
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA07/HA07E.html>

Stern Robert and Csoka. Mammalian hyaluronidases (2001 ou update 2004).

<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15/HA15E.html>

Stern Robert. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology*.vol.**13** no 12 pp.105R. Review (2003).

Stern R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *Eur J Cell Biol.* **83**(7):317-25. Review (2004)

Tool B.P. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* **12**, 37R-42R (2002)

Tool B.P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews/Cancer* **4**, 528-537 (2004).

Triggs-Raine et al. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Genetics* Vol. **96**, Issue 11, 6296-6300 (1999).

Tulkens Paul, Henry Beaufay, and André Trouet. Analytical Fractionation of homogenates from cultured rat embryo fibroblasts. *J.Cell Biol.* Volume **63**.pages 383-401(1974).

Turley E. and Harrison R. RHAMM, a member of the hyaladherins (1999)
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA11/HA11E.html>

Van Hoof F., Mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses. *J. clin. Path.* **27**, Suppl (Roy. Coll. Path), 8, 64-93 (1974).

Wattiaux, Wattiaux-De Coninck, M.F. Ronveaux-Dupal, and F. Dubois. Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J. Cell Biology* Vol **78**. (1978).

Wei, M., Latif, F., Bader, S., Kashuba, V., Chen, J. Y., Duh, F.-M., Sekido, Y., Lee, C-C., Geil, L., Kuzmin, I., et al. Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res*, **56**, 1487-1492 (1996).

Weigel, P.H., Hascall, V.C and Tammi, M. Hyaluronan synthases. *J. Biol. Chem* **272**, 13997-4000 (1997).

Zhang L, Underhill CB, Chen L. Hyaluronan on the surface of tumor cells is correlated with metastatic behavior. *Cancer Res*. **55**(2):428-33 (1995).